

Journal of  
Embryology and Experimental  
Morphology

VOLUME 2

*December 1954*

PART 4

---

PUBLISHED FOR THE COMPANY OF BIOLOGISTS LIMITED

OXFORD : AT THE CLARENDON PRESS

## EDITORIAL BOARD

M. ABERCROMBIE (London)	SIDNIE M. MANTON (London)
G. R. DE BEER (London)	P. B. MEDAWAR (London)
J. D. BOYD (Cambridge)	D. R. NEWTH (London)
J. BRACHET (Brussels)	J. PASTEELS (Brussels)
F. W. R. BRAMBELL (Bangor)	CHR. P. RAVEN (Utrecht)
A. M. DALCQ (Brussels)	A. STEFANELLI (Rome)
E. FAURÉ-FREMIET (Paris)	S. TOIVONEN (Helsinki)
HONOR B. FELL (Cambridge)	C. H. WADDINGTON (Edinburgh)
W. J. HAMILTON (London)	M. W. WOERDEMAN (Amsterdam)
J. HOLTFRETER (Rochester, N.Y.)	ET. C. WOLFF (Strasbourg)
S. HÖRSTADIUS (Uppsala)	J. Z. YOUNG (London)
F. E. LEHMANN (Bern)	S. ZUCKERMAN (Birmingham)

*Editor:* M. ABERCROMBIE

## INFORMATION ABOUT THE JOURNAL

The main object of the Journal is to bring together work concerned with all the kinds of developmental process to be found in animals at any stage of their life-history. It will include work on embryology (descriptive, experimental, chemical, physiological), on regeneration and healing, on the developmental changes involved in functional adaptation, on growth, ageing, and other aspects of late morphogenesis. It will publish studies of gametes and gametogenesis where the work is not primarily of cytological interest; and studies of developmental genetics and of the physiology of reproduction where these fall more within its scope than within the usual scope of existing specialized journals. Papers on those aspects of protozoology which have a bearing on morphogenesis will be acceptable. Papers concerned with developmental processes in plants may be included if they connect with zoological aspects of morphogenesis.

The papers published will for the most part be accounts of finished pieces of research. Preliminary reports will not be published. Theses and very long papers are unlikely to be accepted at present. Theoretical and review papers may be published from time to time, as space allows. Contributions may be in English, French, or German. Contributors wishing to use other languages should consult the Editor.

*Journal of Embryology and Experimental Morphology* is published quarterly. Subscription price £4. 4s. 0d. yearly for the four numbers; for this sum (*prepaid*) the Journal is sent Post Free to any part of the world. Separate numbers price 25s. Correspondence, except that about the subject-matter of the Journal which should be sent to the Editor, should be addressed to the Publisher:

GEOFFREY CUMBERLEGE

OXFORD UNIVERSITY PRESS, AMEN HOUSE, LONDON, E.C. 4

# The Relation of the Interrenal Blastema to the Origin of the Somatic Tissues of the Gonad in Frog Tadpoles

by ENRICO VANNINI<sup>1</sup>

*Institute of Zoology and Comparative Anatomy, University of Modena*

and ARMANDO SABBADIN<sup>1</sup>

*Institute of Zoology and Comparative Anatomy, University of Padova*

WITH THREE PLATES

---

## INTRODUCTION

As long ago as 1941 and 1942 one of us (Vannini) found in a series of developmental stages of frog tadpoles that the somatic components of the medullary tissue of the gonad have their origin in the interrenal blastema, and not, as was then generally supposed, in the mesonephric blastema.

In the earliest stages examined at that time the gonad rudiment had the structure of 'paired genital ridges', lying at each side of the dorsal mesentery, and were furnished with primordial germ-cells, but were still without medullary tissue. The interrenal blastema occupied a median site in the tadpole's body, ventral to the aorta and dorsal to the two subcardinal veins. The mesonephric blastemata appeared distinctly separate from the interrenal rudiment, because they were situated in a more lateral position, contiguous with the Wolffian ducts.

In later stages the medullary tissue ('medulla') penetrated within the genital ridges. This tissue was seen to originate from the interrenal blastema by descending, as cellular cords, along the lateral walls of the posterior vena cava, which had been constituted in the meantime by the median confluence of the two subcardinal veins. The nearby mesonephric blastemata did not take part in this process.

The same origin from the interrenal blastema was also demonstrated for the rudiment of the 'fat bodies', which are a cranially directed continuation of the medullary tissue of the gonads.

The further differentiation of the mesonephric blastemata made them, as they grew, come into immediate contact with the interrenal blastema; it hence became

<sup>1</sup> *Authors' addresses:* Dr. E. Vannini, Istituto di Zoologia e Anatomia comparata, Università di Modena, Modena, Italy; Dr. A. Sabbadin, Istituto di Zoologia e Anatomia comparata, Università di Padova, Via Loredan 6, Padova, Italy.



rather difficult to distinguish a sharp boundary between the former and the latter. The interrenal blastema, however, remained medial to the mesonephric primordia, which were now clearly differentiating their tubular structures; and the medullary tissue, which continued to penetrate into the gonads, was still seen to proliferate from the interrenal zone, far from the mesonephric blastema. Moreover, in these advanced stages, the interrenal (and not mesonephric) origin of the medullary tissue appeared to be corroborated by the fact that its penetration took place even in the more cranial region of the gonads and in the fat bodies, lying at a level of the tadpole's body at which the mesonephric kidneys were no longer present, but only the interrenal blastema persisted.

The frog tadpoles examined in Vannini's work belonged to 'undifferentiated' sexual races, in which the gonads of all the animals first develop in an ovarian direction, while later, starting at the stages of metamorphosis, in half of the specimens (those of male genetical sex) the young ovaries change into testes. As a consequence, in all the tadpoles examined before metamorphosis, the potential testicular medullary tissue of the gonads ceased to proliferate from the interrenal blastema and became excavated at its centre; meanwhile the germ-cells, lying in the potentially ovarian cortical part ('cortex') derived from the paired genital ridges, evolved into oogonia and oocytes in prophase. This constituted the first general differentiation in an ovarian direction. When, during metamorphosis or later, the ovaries of the genetical males became testes, the sex reversal consisted in the fact that the gonads, already excavated at their centre, were re-filled with medullary tissue. As at earlier stages, this new medullary tissue took its origin from the interrenal blastema, in the form of cellular cords which reached the hilum of the gonads by descending along the lateral walls of the posterior vena cava; only in small part could it be considered as derived from residues of the primitive medulla, which had remained to line the entovarian cavities during the preceding transitory female phase.

At the stage of the sex reversal, some of the interrenal cells had assumed the adult appearance and were evidently in a functional state, with abundant, light, and finely vacuolized cytoplasm. Other interrenal cells, on the contrary, retained a more embryonic structure. Only the non-differentiated interrenal cells of the latter type took part in the genesis of medullary tissue cords, which penetrated into the gonads.

Analogous processes of masculinization of the ovaries were also experimentally obtained by the administration of the testosterone to metamorphosing tadpoles. The proliferation of the medullary tissue was found in all the animals submitted to the treatment, and thus also in the genetically female specimens whose ovaries would not have become masculinized spontaneously.

In both spontaneous and induced masculinization the proliferating medullary tissue penetrated the ovarian cortex, disintegrating the nests of germ-cells, and attracted into its substance the oogonia and the oocytes which had not yet begun the first maturation prophase. These germ-cells, surrounded by medullary tissue,

became spermatogonia. With the degeneration of the cortical prophase oocytes the masculinization of the ovaries was completed.

The common embryological origin of the interrenal blastema and gonadal medulla was later demonstrated also in other Anuran tadpoles (Vannini & Busetto, 1945; Vannini, 1947) and in the embryos of birds (Vannini, 1943, 1949) and mammals (Vannini & Cessi, 1949). In other institutes analogous researches have led to concordant results (Papi, 1947, 1949, for the Urodela; Chieffi, 1952, for the Selachii).

Recently one of us (Sabbadin, 1951 *a, b*), re-examining the subject in frog tadpoles, has established some new facts which modify the previous descriptions and extend our knowledge of the relationships between morphogenesis of the gonads and of the interrenal blastema. In particular, it was observed that there is not, in the earlier stages, a complete difference of embryonic origin and, in the later stages, an absolute and irreversible distinction as regards their behaviour between the somatic cells of the cortical and of the medullary parts of the gonads.

In early stages, when the rudiments of the gonads have just appeared at each side of the dorsal mesentery, in the form of paired genital ridges, the first cells which migrate from the interrenal blastema do not form a medullary tissue from the beginning, as was previously thought, but they take part in the genesis of the future gonadal cortex. In fact, they infiltrate into the genital ridges among the primordial germ-cells, contributing to the formation of their follicles by associating themselves with other follicular elements already present. These last were partly derived from the coelomic wall and had partly accompanied the primordial germ-cells in their previous migration from the precocious, unpaired median genital ridge lying at the root of the dorsal mesentery.

The elements which continue to migrate from the interrenal blastema only later cease to infiltrate the peripheral part of the paired genital ridges and remain massed at the centre of the gonadal primordium, forming thus a medullary tissue deprived of germ-cells.

The distinction between cortex and medulla does not, however, appear definitely established even at this stage, because, in fact, when the rudiment of the gonads are differentiating into ovaries, a part of the medullary tissue is incorporated in the cortex and becomes an integral part of it; on the other hand, when later, in the undifferentiated races, the ovaries of genetically male specimens are transformed into testes, a great part of the somatic cells which previously belonged to the cortical territory are incorporated in the proliferated medullary tissue and are assimilated by the latter. An analogous incorporation and assimilation of somatic cells from the cortical to the medullary tissue takes place, earlier, in the male tadpoles of the 'differentiated' races, whose gonads, in very young stages, develop directly into testes without going through a previous phase of ovarian structure.

In short, from these findings of Sabbadin the participation of the interrenal



blastema in the morphogenesis of gonad rudiments is confirmed. Furthermore, it is demonstrated that the interrenal blastema provides not only the elements of the medullary tissue but also a conspicuous part of those of the cortical one. Therefore, during the sex differentiation of the gonads, the somatic cells derived from the interrenal blastema seem to be capable of modulating not only in the direction of masculinizing testicular but also of feminizing ovarian components.

While the series of researches described above was being developed, other studies were being made by Witschi. He had been, since 1914, the most authoritative supporter of the view that the gonad medulla originates from the mesonephric blastema, and that it is absolutely distinct from the somatic cells of the cortex, which were supposed to derive solely from the coelomic wall.

In 1942 Witschi criticized Vannini's conclusions. Returning to a point made in one of his previous works on bird (Witschi, 1935), and disagreeing with the descriptions of most embryologists, Witschi upheld the opinion that in Amphibia and other vertebrates there is no early distinction between mesonephric and interrenal blastemata. Both derive from the same mesodermal territory, the so-called 'intermediate mesoderm' lying between the myotomes and the lateral plates, from which, in Witschi's opinion, the mesonephros, the interrenal organ, and the gonadal medullary tissue originate at different times. According to Witschi (1942) the development of the urogenital apparatus could be schematized by supposing that the intermediate mesoderm is the source of various structures of more or less definitely male or masculinizing character (gonadal medulla and urogenital connexions, mesonephros with vas deferens, interrenal tissue), while the mesoderm of the lateral plate (coelomic wall) gives origin to structures of female nature (gonadal cortex, oviduct).

These suggestions were widely discussed at an international meeting on the sex differentiation of vertebrates in Paris (1950), and reaffirmed in a more recent paper (Witschi, 1951*a*). They have also been developed in a series of experimental researches on frog tadpoles submitted to treatment with high doses of oestradiol (Witschi, 1951*b*, 1953; Segal, 1952, 1953). In accordance with analogous findings reported by Padoa (1938, 1943), it has been established that this intense treatment with estrogen determines a strong hyperplasia of the interrenal tissue, accompanied, according to Witschi, by a quantitative reduction of the mesonephric tubular structures. This would indicate that hyperplasia of the interrenal tissue takes place partly at the expense of cellular elements which normally should have differentiated into mesonephric kidneys.

In Witschi's opinion these results are to be considered as a confirmation of the existence of a single primitive blastema, derived from the intermediate mesoderm and provided with pluripotentiality; he calls it the 'mesonephric blastema', but it can actually differentiate, not only into renal tubules, but also into interrenal tissue, medullary component of the gonad, and efferent ductules of the testis (Witschi, Bruner, & Segal, 1953).

Describing the normal development of the urogenital region in frog tadpoles, Segal (1953) notes the concordance of Witschi's and his own observations with the previous findings of Vannini, with regard to the common embryological origin of interrenal blastema and gonadal medulla. He does not, however, accept Vannini's opinion on the separate origin of the mesonephric and interrenal blastemata, contending that he has not found in Vannini's microphotographs any evidence supporting the derivation of the interrenal blastema from the mesodermal lateral plate (coelomic wall).

In Vannini's observations on the Amphibian tadpoles there is, in fact, such a gap. As we pointed out at the beginning of the present work, the youngest animals studied by him showed the interrenal blastema already almost completely separated from its site of origin and lying dorsally to the subcardinal veins. Its distinction from the mesonephric blastemata appeared evident from microscopical examination; but its derivation from the coelomic wall, instead of from the intermediate mesoderm, was accepted only on the basis of other work (Brauer, Jona, Giacomini), and not as a result of personal findings.

Segal himself, however, did not go back to earlier developmental stages than those seen by Vannini. He also, therefore, was not able to recognize the real place of origin of the interrenal blastema and, on the basis of Witschi's statement, believed that it developed from the intermediate mesoderm, forming a single whole together with the mesonephric blastema. Segal's observations do not, consequently, settle the controversy.

The present researches have been instituted with the purpose of filling the gap existing in the work of both Vannini's and Witschi's schools. We therefore went back to earlier stages of development than those so far considered.

Our first purpose was to recognize the exact place of origin of the interrenal blastema in order to establish whether this really arises in the same mesodermal tract from which the mesonephric blastema comes, or from a different territory.

Returning to our earlier researches quoted above, we further wished to establish more precisely the participation of the interrenal blastema in the genesis of both the medullary (Vannini, 1942) and the cortical tissue (Sabbadin, 1951 *a, b*) of the gonadal rudiment.

Finally, taking also into account the more recent experimental results of Witschi's school (1953), we wished to suggest our own interpretation of the embryogenesis of the gonads, the mesonephric kidneys, and the interrenal organs in Amphibian tadpoles. Such an interpretation appears, perhaps, more complicated than the usual ones; but it seems to us to adhere very closely to our own findings and it can possibly indicate a line of conciliation between the discordant opinions.

#### OBSERVATIONS

Our observations were carried out on the initial developmental stages of *Rana*



blastema in the morphogenesis of gonad rudiments is confirmed. Furthermore, it is demonstrated that the interrenal blastema provides not only the elements of the medullary tissue but also a conspicuous part of those of the cortical one. Therefore, during the sex differentiation of the gonads, the somatic cells derived from the interrenal blastema seem to be capable of modulating not only in the direction of masculinizing testicular but also of feminizing ovarian components.

While the series of researches described above was being developed, other studies were being made by Witschi. He had been, since 1914, the most authoritative supporter of the view that the gonad medulla originates from the mesonephric blastema, and that it is absolutely distinct from the somatic cells of the cortex, which were supposed to derive solely from the coelomic wall.

In 1942 Witschi criticized Vannini's conclusions. Returning to a point made in one of his previous works on bird (Witschi, 1935), and disagreeing with the descriptions of most embryologists, Witschi upheld the opinion that in Amphibia and other vertebrates there is no early distinction between mesonephric and interrenal blastemata. Both derive from the same mesodermal territory, the so-called 'intermediate mesoderm' lying between the myotomes and the lateral plates, from which, in Witschi's opinion, the mesonephros, the interrenal organ, and the gonadal medullary tissue originate at different times. According to Witschi (1942) the development of the urogenital apparatus could be schematized by supposing that the intermediate mesoderm is the source of various structures of more or less definitely male or masculinizing character (gonadal medulla and urogenital connexions, mesonephros with vas deferens, interrenal tissue), while the mesoderm of the lateral plate (coelomic wall) gives origin to structures of female nature (gonadal cortex, oviduct).

These suggestions were widely discussed at an international meeting on the sex differentiation of vertebrates in Paris (1950), and reaffirmed in a more recent paper (Witschi, 1951*a*). They have also been developed in a series of experimental researches on frog tadpoles submitted to treatment with high doses of oestradiol (Witschi, 1951*b*, 1953; Segal, 1952, 1953). In accordance with analogous findings reported by Padoa (1938, 1943), it has been established that this intense treatment with estrogen determines a strong hyperplasia of the interrenal tissue, accompanied, according to Witschi, by a quantitative reduction of the mesonephric tubular structures. This would indicate that hyperplasia of the interrenal tissue takes place partly at the expense of cellular elements which normally should have differentiated into mesonephric kidneys.

In Witschi's opinion these results are to be considered as a confirmation of the existence of a single primitive blastema, derived from the intermediate mesoderm and provided with pluripotentiality; he calls it the 'mesonephric blastema', but it can actually differentiate, not only into renal tubules, but also into interrenal tissue, medullary component of the gonad, and efferent ductules of the testis (Witschi, Bruner, & Segal, 1953).



Describing the normal development of the urogenital region in frog tadpoles, Segal (1953) notes the concordance of Witschi's and his own observations with the previous findings of Vannini, with regard to the common embryological origin of interrenal blastema and gonadal medulla. He does not, however, accept Vannini's opinion on the separate origin of the mesonephric and interrenal blastemata, contending that he has not found in Vannini's microphotographs any evidence supporting the derivation of the interrenal blastema from the mesodermal lateral plate (coelomic wall).

In Vannini's observations on the Amphibian tadpoles there is, in fact, such a gap. As we pointed out at the beginning of the present work, the youngest animals studied by him showed the interrenal blastema already almost completely separated from its site of origin and lying dorsally to the subcardinal veins. Its distinction from the mesonephric blastemata appeared evident from microscopical examination; but its derivation from the coelomic wall, instead of from the intermediate mesoderm, was accepted only on the basis of other work (Brauer, Jona, Giacomini), and not as a result of personal findings.

Segal himself, however, did not go back to earlier developmental stages than those seen by Vannini. He also, therefore, was not able to recognize the real place of origin of the interrenal blastema and, on the basis of Witschi's statement, believed that it developed from the intermediate mesoderm, forming a single whole together with the mesonephric blastema. Segal's observations do not, consequently, settle the controversy.

The present researches have been instituted with the purpose of filling the gap existing in the work of both Vannini's and Witschi's schools. We therefore went back to earlier stages of development than those so far considered.

Our first purpose was to recognize the exact place of origin of the interrenal blastema in order to establish whether this really arises in the same mesodermal tract from which the mesonephric blastema comes, or from a different territory.

Returning to our earlier researches quoted above, we further wished to establish more precisely the participation of the interrenal blastema in the genesis of both the medullary (Vannini, 1942) and the cortical tissue (Sabbadin, 1951 *a, b*) of the gonadal rudiment.

Finally, taking also into account the more recent experimental results of Witschi's school (1953), we wished to suggest our own interpretation of the embryogenesis of the gonads, the mesonephric kidneys, and the interrenal organs in Amphibian tadpoles. Such an interpretation appears, perhaps, more complicated than the usual ones; but it seems to us to adhere very closely to our own findings and it can possibly indicate a line of conciliation between the discordant opinions.

#### OBSERVATIONS

Our observations were carried out on the initial developmental stages of *Rana*

*esculenta* tadpoles. We present here a description of the development of the urogenital organs, i.e. the mesonephric kidneys, the interrenal tissue, and the gonads. We give the age of our material in relation to the time of hatching from the egg membranes; we have not indicated stages by the usual criteria of the normal developmental tables, but will do so in subsequent researches, which we propose to carry out on various Amphibian species, going back also to earlier embryonic stages than those considered here.

### *Mesonephric kidneys and interrenal organs*

Our observations are concerned firstly with the 'mesonephric blastema', supposed by Witschi to be derived from the intermediate mesoderm and to give rise not only to the mesonephros but also to the interrenal tissue and the gonadal medulla.

In Plate 1, fig. A and fig. B, the presumed 'mesonephric blastema' (in Witschi's sense) is shown at two different body levels in the same specimen, aged about 4 days after hatching. In Fig. A the interrenal territory, lying on the dorsal and lateral walls of the vena cava, appears well distinct from the primary mesonephric vesicles, which occupy a more lateral site. In contrast, such a distinction between mesonephric and interrenal materials is no longer possible in Fig. B, a section cut in the interval between two successive groups of mesonephric vesicles, which could thus give the impression that there exists only a single blastema.

According to Witschi, such a single blastema is the primitive mesonephric blastema, from which the interrenal territory would take its origin by a secondary medial segregation. Vannini, on the other hand, as we have seen, holds that there are two blastemata distinct from the beginning, differing in their origin as well as in their prospective value.

By examining earlier developmental stages than those so far described, we propose to confirm and document Vannini's opinion.

(a) *Development of the interrenal blastema.* In early developmental stages the interrenal blastema originates from the lateral plates, where the somatopleure passes into the splanchnopleure and the splanchnopleures of the two sides adhere together, forming the dorsal mesentery. The cephalic end of the interrenal blastema reaches a body level slightly anterior to the point at which the mesenteric artery leaves the aorta. At this level the blastema shows the first stages of its proliferation, appearing in the form of cords of embryonic cells which arise from the mesenteric area and move towards the ventral wall of the aorta; they constitute a retroperitoneal extension of other similar materials which are accumulating between the two splanchnopleuric laminae in the dorsal mesentery. By displacing themselves along the walls of the mesenteric artery the interrenal cells arrive in contact with the ganglia of the sympathetic chains (Plate 1, fig. C).

More caudally, behind the mesenteric artery, the aorta moves dorsally away from the coelomic wall, while the subcardinal veins converge towards the median body plane. The cells of the interrenal blastema accompany the aorta in its



change of position. From this level along to its caudal end the blastema constitutes a sort of median bridge, or peduncle, stretching from the coelomic wall to the aorta, lying between the two subcardinal veins as a continuation of the dorsal mesentery (Plate 1, figs. D, E; Plate 2, figs. F, G, L).

The interrenal blastema maintains such a configuration for a few days after hatching. In later stages it presents important modifications in its major tract, caudally to the mesenteric artery. Up to a level which becomes more and more cephalic during the course of development, the peduncle is broken by the confluence of the subcardinal veins, which unite forming the vena cava (Plate 2, fig. I; Plate 3, fig. M). Its continuity with the coelomic wall will be re-established a little later by the development of cellular cords which descend from the blastema along the lateral walls of the vena cava (Plate 2, fig. H; Plate 1, figs. A, B).

The interrenal blastema ends caudally at a level slightly in front of that of the opening of the Wolffian ducts into the cloaca (Plate 3, fig. N). More caudally, in place of the interrenal blastema only scanty mesenchymal cells are found.

(b) *Development of the mesonephric kidneys.* In the earlier stages examined by us the material destined to form the mesonephric kidneys constitutes, on each side of the body, a compact nephrogenic cord which appears in the form of a ridge in transverse sections. At first these nephrogenic cords are dorsal to the Wolffian ducts; later they move towards the median plane on the dorsal walls of the subcardinal veins (Plate 1, fig. E; Plate 3, fig. O).

It is generally considered that in all the vertebrates the nephrogenic cords derive from the intermediate mesoderm lying between the myotomes and the lateral plate. Van Geertruyden (1948) pointed out, however, that in Anuran embryos this intermediate mesoderm does not appear so well delimited as in other vertebrates and surmises that in frog tadpoles the nephrogenic cords may originate from the concentration of scattered and more medial cells, proliferated by the mesoderm of the lateral plates, in the zone of union between somatopleure and splanchnopleure. This author does not seem to have noticed that the cells to which she refers constitute the interrenal blastema whose development we have just described and which proliferates from the above-mentioned mesodermal zone at the root of the dorsal mesentery.

We have not yet examined sufficiently early developmental stages to express a personal opinion on the absence of well-defined intermediate mesoderm in Anuran embryos. We must, however, state that Van Geertruyden's suggestion on the genesis of the nephrogenic cords does not appear to be convincing. Van Geertruyden based her own statement chiefly on the form of the nephrogenic cords, which are flattened at the median edge, i.e. that turned towards the site of the interrenal blastema. We must note, however, that the cells of these cords are different from the scattered interrenal cells, not only because they are very crowded among themselves, but also because they are much richer in yolk granules; this excludes the possibility of their derivation from the cells of the

interrenal blastema, which have by this time almost completely consumed their own yolk.

The mesonephric blastemata must surely therefore be segregated from a different site than that of the interrenal primordium; their place of origin is probably analogous to the intermediate mesoderm of other vertebrates, even if it is less defined in Anuran embryos. In young stages the nephrogenic cords appear clearly distinct from the interrenal blastema, which during the initial phase of its development is extended from the coelomic wall towards the ventral face of the aorta, in a central site between the two subcardinal veins (Plate 1, fig. E); it must be noted that these nephrogenic primordia are present only at the levels of the caudal half of the interrenal blastema, while there is no trace of them in its cephalic half (Plate 1, figs. C, D). In younger stages the nephrogenic cords are already present, medially to the Wolffian ducts, while the proliferation of the interrenal blastema from the dorsal mesentery has not yet attained the ventral face of the aorta (Plate 3, fig. O).

In further development the nephrogenic cords present metameric swellings, which soon become isolated giving rise to primary mesonephric vesicles, from which the renal tubules are later differentiated (Plate 1, fig. A; Plate 3, fig. N). In the intervals between the mesonephric vesicles the undifferentiated material of the nephrogenic cords dissociates itself into scattered cells which join themselves to the interrenal blastema and may constitute a reserve for the further development of the mesonephric kidneys (Plate 1, fig. B).

(c) *Relationships between interrenal blastema and mesonephric kidneys.* As we have already seen, the materials described above, which give rise to the interrenal tissue and the mesonephric kidneys, are associated by Witschi under the general name of 'mesonephric blastema'. This, according to him, has a unitary origin from the intermediate mesoderm, and the components of the interrenal tissue are a secondary derivative of it.

Our observations show, on the contrary, that there are two kinds of blastemata of different embryonic origin. The gap, pointed out by Segal (1953) in the previous work of Vannini, has in fact been filled by the description of earlier developmental stages which document the proliferation of the interrenal blastema from the material of the lateral plates at the level of the mesenteric root. In the same early stages the mesonephric blastemata are also present in the form of nephrogenic cords, well separated and distinct from the interrenal territory; they are certainly derived from another site, corresponding in all probability to the so-called intermediate mesoderm. Vannini's opinion seems thus to be confirmed.

The findings reported by Witschi and Segal, that in frog tadpoles treated with high doses of estrogenic hormones the interrenal tissue may undergo an increase at the expense of mesonephric material, do not necessarily demonstrate the common derivation of the mesonephros and the interrenal organ from the same primitive blastema. They rather seem to demonstrate that cells of an embryonic character, belonging to a blastema of a given prospective value, are also capable,



in suitable conditions, of differentiating in a different direction corresponding to that of a blastema which has had its origin in a contiguous site of the mesoderm.

An opposite phenomenon, namely the differentiation in a mesonephric sense of cells which would seem to belong to the interrenal blastema, is suggested by an observation of Van Geertruyden (1948). She pointed out that in frog tadpoles older than those studied here there are added to the first mesonephric tubules, which directly originate from the nephrogenic cords described above, new generations of renal tubular structures derived from scattered cells lying more medially. Probably for the most part these scattered cells are those derived (as we have already seen) from the dissociation of the nephrogenic cords, in the intervals between the primary mesonephric vesicles. But, as we have seen, these cells of nephrogenic origin join themselves to the lateral faces of the interrenal blastema and mix with this, so that there is no possibility of a morphological distinction; therefore it is possible that at least a part of the elements which take part in the formation of new renal tubules are cells belonging to the interrenal blastema, derived from the mesenteric root, in the same manner as, in the treatments with high doses of estrogen, it is possible that the components of the hyperplastic interrenal tissues are partly derived from the nephrogenic cords.

#### *Interrenal blastema and gonads*

In early developmental stages the primordial germ-cells, having migrated from the dorsal region of the entoderm, reach the root of the dorsal mesentery where they arrange themselves in a median 'unpaired genital ridge' (Plate 3, fig. O). Here they are plunged into that same somatic material which, we hold, constitutes the first rudiment of the interrenal blastema; and here they begin to be surrounded by the first follicular, or enveloping, somatic elements which, as we have already pointed out, will accompany them in their further migration towards the gonads (Plate 2, fig. L). The fact that these first somatic enveloping cells derive from the same site as the interrenal blastema seems to us to be of remarkable interest; we had not had occasion to point this out in previous researches.

In later stages the germ-cells, moving in a ventrolateral direction, collect themselves in the coelomic wall at each side of the dorsal mesentery, forming the two paired genital ridges (Plate 1, figs. B, E; Plate 2, figs. I, L; Plate 3, fig. M). Very soon, when the confluence of the two subcardinal veins leads to the formation of the posterior vena cava, the genital ridges come into relationship with the interrenal blastema by means of the development of cellular cords descending from the interrenal blastema along the lateral walls of the vena cava (Plate 1, fig. B; Plate 2, fig. H).

Meanwhile each genital ridge organizes itself, little by little, into a primordial gonad. The coelomic wall is inflected in the area of the paired genital ridges, stretching itself into two folds projecting into the general body cavity; these folds contain the primordial germ-cells, with their surrounding somatic elements. Each

genital fold remains connected to the coelomic wall by means of a short mesogonium. The germ-cells, which move in an apical direction in the folds, occupy at first all the thickness of the gonadal rudiment, plunged in a somatic material which is only partly made up of the cells of the coelomic wall, but consists mainly of elements originating from the interrenal blastema. The latter continues for some time to take part in the genesis of the follicles enveloping the germ-cells; but very soon it begins also to provide that somatic material which will later form the medullary tissue of the gonads.

In subsequent phases the germ-cells remain localized in the peripheral part of the gonad. The latter thus appears constituted at its periphery by a cortical region, containing the germ-cells, and at its centre by a medullary tissue deprived of them. The medullary tissue still appears to be connected with the interrenal blastema, which continues to provide it with cellular somatic elements (Plate 3, fig. P). At this stage the rudiments of the gonads are ready to begin their sexual differentiation in either a male or a female direction.

Such findings confirm and complete our previous observations on the participation of the interrenal blastema in both the genesis of the medullary tissue (Vannini, 1941, 1942) and the constitution of the cortical part (Sabbadin, 1951 *a, b*) of the Amphibian gonad. They confirm, moreover, that the mesonephric blastemata do not participate in gonad organization.

#### DISCUSSION

The present researches lead us in the first place to point out that the components of the interrenal blastema originate in frog embryos from the mesoderm of the lateral plates, at the boundary zone between the somatopleure and the splanchnopleure, i.e. at the root of the dorsal mesentery.

Such a site of proliferation does not coincide with that from which the mesonephric blastemata derive. The latter are segregated as nephrogenic cords from another mesodermal tract, probably related to the region of the intermediate mesoderm. The nephrogenic cords are localized in a more lateral site with respect to the interrenal blastema.

We have thus confirmed the most generally held opinion, according to which the mesonephric rudiments have a separate origin from the interrenal tissue primordia, the latter deriving from the lateral plates or, to use another word, from the future coelomic wall (Celestino da Costa, 1952).

In our opinion the doubts on this subject found in the literature are partly due to the fact that workers on the development of the Amphibian mesonephric kidneys have not, in the main, taken into account the existence of the interrenal blastema. Thus, from an examination of the figures in his papers, it appears that Gray (1930, 1932, 1936) named 'mesonephric blastema' a tissue lacking tubular arrangement, which we know to consist, at least in its more medial part, of cells with an interrenal destiny. Van Geertruyden (1948), while describing exactly the



median cellular proliferation at the root of the dorsal mesentery, supposes that it gives origin to the nephrogenic cords instead of to the interrenal blastema.

As regards the above-quoted works of Witschi and Segal, they do not go back to the earliest stages of development of the interrenal blastema, which is only considered after its separation from its site of origin, when it is joining to the contiguous mesonephric primordia. In our opinion it is a mistake, therefore, to consider the interrenal material as a secondary derivative of the mesonephric blastema.

By the study of very early developmental stages we have been able to establish that the mesonephric blastemata do not collaborate in the genesis of gonads, while on the contrary the interrenal blastema does participate very extensively in it.

One of us (Sabbadin, 1951 *a, b*) has pointed out already that the first cells of the interrenal blastema which penetrate into the paired genital ridges do not immediately form the definitive gonad medulla, but take part in the constitution of the young gonad cortex, associating in this with other somatic cells of the coelomic wall. Our present observations, besides confirming these findings, also show that the primitive somatic elements surrounding the germ-cells, at the early stage of the median unpaired genital ridge, are a part of the same proliferation which generates the interrenal blastema. These follicular cells later will accompany the primordial germ-cells in their migration towards the cortex of the gonads (Witschi, 1914).

On the other hand, those cortical somatic cells of the paired genital ridges, which originate directly from the coelomic wall at each side of the dorsal mesentery, have the same derivation from the lateral plates as has the interrenal blastema. Hence the sharp distinction stated to exist by Witschi (1942) between territories of male potentiality, which he considers related to the mesonephros, and territories of female potentiality, derived from the coelomic wall, seems to be blurred. We consider it more correct to counterpose on the one hand the interrenal blastema and the two gonadal territories, derived from the lateral plates, and on the other hand the mesonephric blastemata, derived from the intermediate mesoderm.

The relationships of embryological origin which have been demonstrated between interrenal blastema and gonadal medulla were related by one of us (Vannini, 1942) to the well-known chemical and physiological likeness of the hormones to be secreted by these structures when they have differentiated in the adult. The most recent report on the embryonic relationships between gonadal cortex and gonadal medulla leads us to extend this hypothesis. The likeness in the steroid structure of all the hormones secreted by the adrenal cortex (interrenal tissue), the testis, and the ovary agrees, in fact, with the common embryological derivation, from the lateral plate, of all these organs.

Sabbadin (1951 *a, b*) has already pointed out that, even at the stage of sex

differentiation, cortical and medullary gonad materials are capable of modulating in either an ovarian or a testicular direction. In fact, either the cortical tissue (which, activated by genic factors, acquires feminizing properties in female differentiation), or the medullary one (which acquires masculinizing activities in male differentiation), are both able partly to assimilate the heterologous tissue, which had conserved some physiological indifference.

During this assimilation of tissues a territory of a given prospective value secondarily assumes the prospective value of the assimilating contiguous field. Such a phenomenon is not infrequent in organogenetic processes. To it is perhaps to be referred the increase of interrenal tissue at the expense of mesonephric materials, reported by Witschi and by Segal in experimental treatment with high doses of estrogen, and, on the other hand, in normal development, the participation, noticed by Van Geertruyden, of cells belonging to the interrenal territory in the genesis of secondary mesonephric structures.

One cannot be very surprised if in the boundary zone between two different mesodermal blastemata the destiny of the single cells does not appear strictly determined. In the embryonic system considered above the morphogenetic potentialities, or prospective fates, of contiguous territories, in fact, seem to grade one into the other, without it being possible to trace a perfectly definite demarcation line between them.

The sex differentiation of the Amphibian gonads is certainly controlled by the alternative development of either the cortical or the medullary somatic components, as was already pointed out in Witschi's classical works. Nevertheless, these gonad territories do not appear from the beginning distinctly separated or predetermined, either in their embryological origin or in their morphogenetic function; their differentiation seems rather to be epigenetically established, during ovarian or testicular morphogenesis, by the directive activity of the female or male genetical factors which operate on somatic elements showing a common embryonic origin.

Summing up, in the organogenetic area considered above, the interrenal blastema and the medullary and cortical territories of the gonads on the one hand and the mesonephric blastemata on the other do not seem to have from the beginning an irreversibly determined destiny. On the contrary, they seem to be at first pluripotential materials whose various morphological and physiological differentiations are gradually established during further development.

#### SUMMARY

1. In frog tadpoles the interrenal blastema proliferates from the lateral plates in the zone where the splanchnopleures meet to form the dorsal mesentery. At first the interrenal proliferation appears distinct and separate from the mesonephric blastemata which, in the form of nephrogenic cords, occupy a more lateral site. In later stages the interrenal blastema moves dorsally from its site of



origin to join secondarily, under the aorta, the medial faces of the mesonephric blastemata, which are now differentiating their tubular structures.

2. The interrenal blastema in early stages contracts relationships with the primordial germ-cells, when the latter form a median unpaired genital ridge at the mesenteric root; and it provides these cells with the first somatic follicular elements, which will then take part in the genesis of the gonadal cortex. A further participation of the interrenal blastema in the constitution of the gonadal cortex is also observed later, at the stage when paired genital ridges lie one at each side of the dorsal mesentery. In this stage interrenal cells descend towards the gonadal primordia, moving down along the walls of the vena cava, and penetrate between the germ-cells, contributing further to the formation of their follicles. The interrenal blastema later continues to penetrate into the gonadal rudiment, now providing only medullary tissue.

3. Such embryological relationships between the interrenal blastema and the somatic cortical and medullary tissues of the gonads suggest the following points.

(a) They appear to be in accord with the chemical and physiological likeness of the steroid hormones which will be secreted by these tissues in the adult.

(b) They further suggest that sex differentiation of the Amphibian gonads is not based on a predetermined antagonism between a cortical and a medullary somatic tissue, each different from the beginning both in activity and in embryonic origin. On the contrary, the common embryological derivation of these territories agrees very well with their reported power of partly modulating themselves in either an ovarian or a testicular direction, according to the gonadal sex differentiation. The feminizing potentiality of the cortex on the one hand, and the masculinizing potentiality of the medulla on the other hand, seem thus to establish themselves little by little, during the process of gonad differentiation, under the activity of the genetical factors of sex determination.

4. Analogous powers of transforming their morphogenetic destinies seem also to have already been reported, by other workers, for the cells lying in the boundary zone between the interrenal and the mesonephric blastemata. All the blastemata of the urogenital area, which have a mesodermal origin, seem therefore to be endowed with a certain degree of pluripotentiality, their definitive morphogenetical determination being gradually attained in the course of development.

#### ACKNOWLEDGEMENT

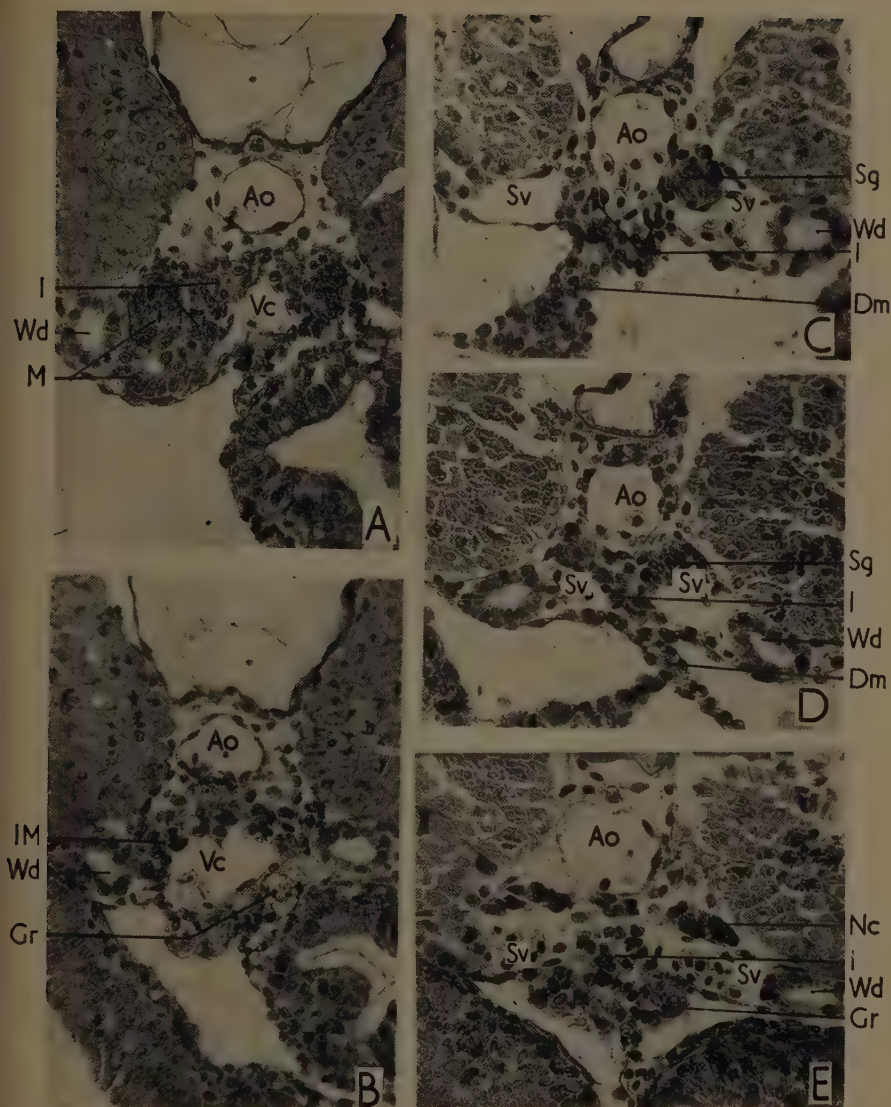
The present work has been financed by the Consiglio Nazionale delle Ricerche, to which we extend our warm thanks.

#### REFERENCES

- CELESTINO DA COSTA, A. (1952). *Le Cortex surrénal*. Paris: Masson.  
CHIEFFI, G. (1952). Sull'organogenesi dell'interrenale e della medulla della gonade in *Torpedo ocellata* e in *Scylliorhinus canicula*. *Pubbl. Staz. zool. Napoli*, **23**, 186-200.  
Colloques internationaux du C.N.R.S. (1950). *La différenciation sexuelle chez les Vertébrés*. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique.

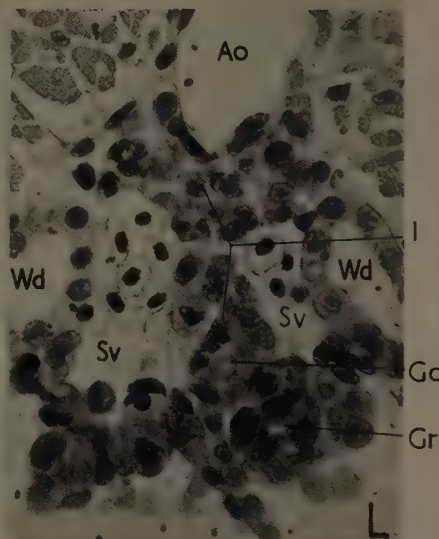
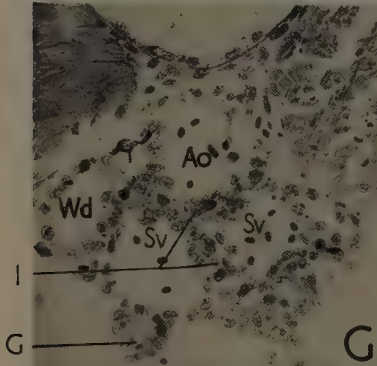
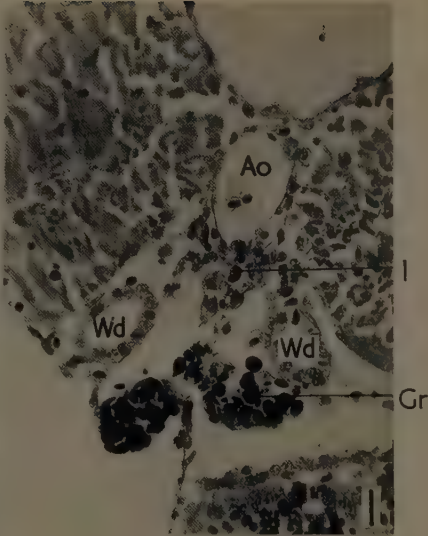
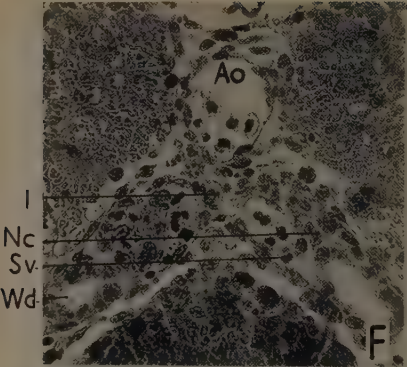
- GRAY, P. (1930). The development of the Amphibian kidney. Part I. The development of the mesonephros of *Rana temporaria*. *Quart. J. micr. Sci.* **73**, 507-46.
- (1932). The development of the Amphibian kidney. Part II. The development of the kidney of *Triton vulgaris* and a comparison of this form with *Rana temporaria*. *Quart. J. micr. Sci.* **75**, 425-65.
- (1936). The development of the Amphibian kidney. Part III. The post-metamorphic development of the kidney, and the development of the vasa efferentia and seminal vesicles in *Rana temporaria*. *Quart. J. micr. Sci.* **78**, 445-73.
- PADOA, E. (1938). La differenziazione del sesso invertito mediante la somministrazione di ormoni sessuali. Ricerche con follicolina in *Rana esculenta*. *Arch. ital. Anat. Embriol.* **40**, 122-65.
- (1943). Il differenziamento del sesso invertito mediante la somministrazione di ormoni sessuali e cortico-surrenali. Ricerche con diidrofollicolina, progesterone e acetato di desossicorticosterone, in *Rana esculenta*. *Pubbl. Staz. zool. Napoli*, **19**, 185-223.
- PAPI, F. (1947). Osservazioni sulla struttura delle gonadi di tritoni ibridi in riferimento alla genesi del tessuto midollare. *Atti Soc. tosc. Sci. nat.* **54**, 3-7.
- (1949). La gonade femminile dell'ibrido *Triton cristatus* ♀ × *T. vulgaris* ♂. *Atti Soc. tosc. Sci. nat.* **56**, 3-24.
- SABBADIN, A. (1951a). Alcuni aspetti del differenziamento sessuale di una razza ben differenziata di *Rana esculenta*, in relazione con la teoria dei differenziatori sessuali. *Riv. Biol.* **43**, 107-29.
- (1951b). Studio morfologico e quantitativo sullo sviluppo delle gonadi di una razza indifferenziata di *Rana dalmatina*. Considerazioni intorno al differenziamento sessuale negli Anfibi Anuri. *Arch. zool. (ital.)*, *Napoli*, **36**, 167-217.
- SEGAL, S. J. (1952). Embryology of adrenal hyperplasia following estrogen administration. *Anat. Rec.* **113**, 553.
- (1953). Morphogenesis of the estrogen induced hyperplasia of the adrenals in larval frogs. *Anat. Rec.* **115**, 205-29.
- VAN GEERTRUYDEN, J. (1948). Les premiers stades développement du mésonephros chez les Amphibiens anoures. *Acta neerl. morph.* **6**, 1-17.
- VANNINI, E. (1941). La partecipazione del tessuto interrenale nell'organogenesi della gonade e nei processi di intersessualità giovanile della *Rana agilis*. *R. C. Accad. Ital.* **2**, 777-85.
- (1942). Sull'origine interrenale dei cordoni della rete e dei corpi grassi durante lo sviluppo delle gonadi e sulla partecipazione dell'interrenale ai processi di intersessualità giovanile nella *Rana agilis*. *Atti Accad. Ital.* **13**, 731-87.
- (1943). Sull'origine interrenale del tessuto midollare della gonade nell'embrione di pollo. *Atti Accad. Ital.* **14**, 493-502.
- (1947). Sviluppo e differenziamento delle gonadi nei girini di *Bombina pachypus*. *Arch. zool. (ital.)*, *Napoli*, **31**, 173-88.
- (1949). A proposito dell'origine interrenale del tessuto midollare della gonade negli Anfibi e negli Uccelli. *R.C. Accad. Lincei*, **6**, 511-18.
- & BUSETTO, I. (1945). Origine interrenale del tessuto midollare della gonade e sviluppo dell'organo di Bidder nel *Bufo bufo* (L.) e nel *Bufo viridis* Laur. *Atti Ist. veneto*, **104**, 631-80.
- & CESSI, T. (1949). Comunanza di origine fra il blastema della corteccia surrenale e il tessuto midollare della gonade nell'embrione di cavia. *R.C. Accad. Lincei*, **6**, 650-6.
- WITSCHI, E. (1914). Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Keimdrüsen von *Rana temporaria*. *Arch. mikr. Anat.* **85**, 9-113.
- (1935). Origin of asymmetry in the reproductive system of birds. *Amer. J. Anat.* **56**, 119-41.
- (1942). Hormonal regulation of development in lower vertebrates. *Cold Spr. Harb. Sym. quant. Biol.* **10**, 145-51.
- (1951a). Embryogenesis of the adrenal and the reproductive glands. *Recent Progr. Hormone Res.* **6**, 1-27.
- (1951b). Adrenal hyperplasia in larval frogs treated with natural estrogens. *Anat. Rec.* **111**, 451.
- (1953). The experimental adrenogenital syndrome in the frog. *Journ. clin. Endocrinol.* **13**, 316-29.
- , BRUNER, J. A., & SEGAL, S. J. (1953). The pluripotentiality of the mesonephric blastema. *Anat. Rec.* **115**, 381.





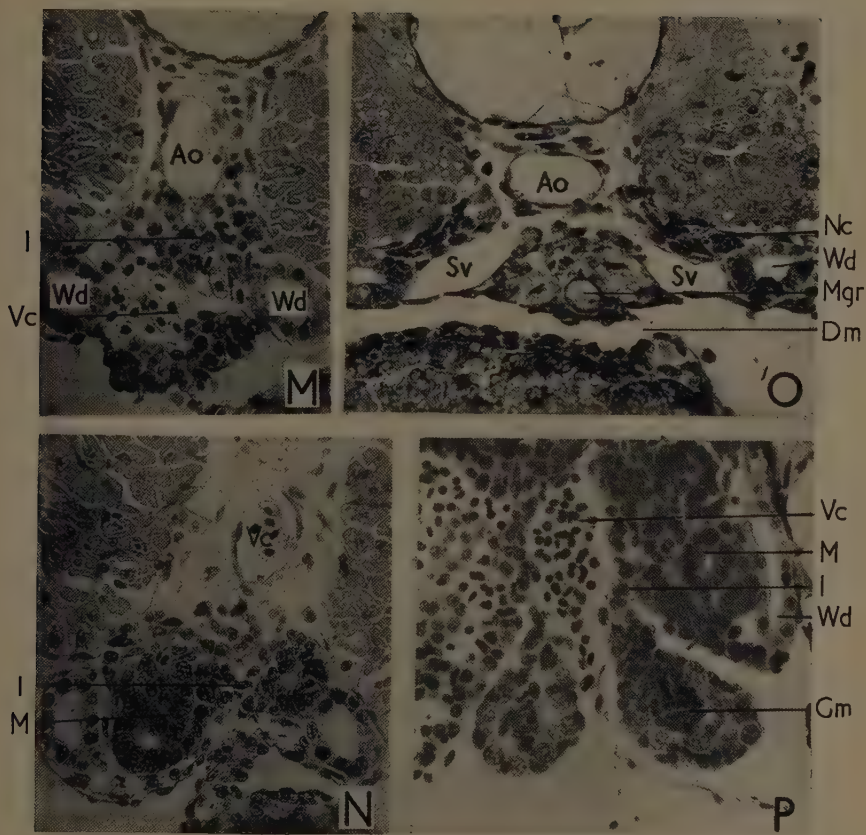
E. VANNINI & A. SABBADIN

Plate 1



E. VANNINI & A. SABBADIN

*Plate 2*



E. VANNINI & A. SABBADIN

*Plate 3*





## EXPLANATION OF PLATES

ABBREVIATIONS: *Ao*, aorta; *Dm*, dorsal mesentery; *G*, gonad; *Gc*, germ-cells; *Gm*, gonadal medulla; *Gr*, paired genital ridge; *I*, interrenal blastema; *IM*, joined interrenal and mesonephric blastemata; *M*, mesonephric blastema; *Mgr*, median unpaired genital ridge; *Nc*, nephrogenic cord; *Sg*, sympathetic ganglion; *Sv*, subcardinal vein; *Vc*, posterior vena cava; *Wd*, Wolffian duct.

## PLATE 1

FIGS. A and B: from a 4-days-old tadpole, transverse sections at two different body levels. In Fig. A, on the lateral walls of the vena cava (*Vc*) is the interrenal blastema (*I*), which extends ventrally to the coelomic wall. Laterally are present some mesonephric vesicles (*M*), more developed on the left side. In Fig. B, at a more cephalic level, undifferentiated mesonephric material is joined to the interrenal blastema, from which it is not distinguishable (*IM*).  $\times 240$ .

FIGS. C, D, and E: from a 3-days-old tadpole, transverse sections at progressively more caudal levels. In Fig. C the interrenal blastema (*I*) proliferates from the site of the dorsal mesentery (*Dm*) and lies against the walls of the aorta (*Ao*), slightly caudally to the mesenteric artery. In Figs. D and E the interrenal blastema (*I*) extends from the coelomic wall towards the aorta (*Ao*), between the subcardinal veins (*Sv*). Only at the more caudal level (Fig. E) are mesonephric materials present, in the form of nephrogenic cords (*Nc*).  $\times 240$ .

## PLATE 2

FIG. F: from a 1-day-old tadpole, at a slightly more cephalic level than in Fig. E. The interrenal blastema (*I*) lies between the subcardinal veins (*Sv*); more laterally, mesonephric materials are present, in the form of vesicles at the left side, of a nephrogenic cord (*Nc*) at the right.  $\times 240$ .

FIGS. G and H: from a 4-days-old tadpole, at two different body levels. More cephalically (Fig. G) the interrenal blastema (*I*) lies between the subcardinal veins (*Sv*). More caudally (Fig. H) the posterior vena cava (*Vc*) has been formed by the median confluence of the subcardinal veins, and the interrenal blastema (*I*), by moving down along its lateral walls, makes contact again with the coelomic wall.  $\times 240$ .

FIG. I: from a 5-days-old tadpole. The interrenal blastema (*I*) has been interrupted by the median confluence of the subcardinal veins and segregated against the ventral wall of the aorta (*Ao*).  $\times 240$ .

FIG. L: from another 5-days-old tadpole, at a more cephalic level than in Fig. I. The interrenal blastema (*I*) lies between the subcardinal veins (*Sv*), which have almost joined each other on the median line, and it assumes relationships with the germ-cells (*Gc*) of the paired genital ridge (*Gr*), at each side of the dorsal mesentery.  $\times 470$

## PLATE 3

FIGS. M and N: from the same 5-days-old tadpole as in Fig. L, at progressively more caudal levels. In Fig. M the interrenal blastema (*I*), after the constitution of the vena cava (*Vc*), has been segregated on the ventral wall of the aorta; paired genital ridges are present at each side of the dorsal mesentery. In Fig. N are present mesonephric vesicles (*M*) and, between them, some cells of the most caudal part of the interrenal blastema (*I*).  $\times 240$ .

FIG. O: from a tadpole at the hatching stage. The germ-cells, lying in a median unpaired genital ridge (*Mgr*) at the root of the dorsal mesentery (*Dm*, broken during sectioning), are enveloped by cells of the interrenal blastema; more laterally, the materials of the mesonephric blastemata are present in the form of nephrogenic cords (*Nc*).  $\times 240$ .

FIG. P: from a 19-days-old tadpole. The gonad medulla (*Gm*) is proliferating from the interrenal blastema (*I*), lying medially to the mesonephric kidneys (*M*).  $\times 240$ .

(Manuscript received 12 : iii : 54)

# Présentation d'un appareil destiné à faire à de jeunes embryons d'oiseaux de petites injections localisées de substances chimiques

par P. ANCEL et J. HOUGET<sup>1</sup>

LES injections de substances chimiques au cours des premiers jours de l'incubation en vue d'obtenir des malformations d'embryons d'oiseaux ont été faites suivant les auteurs dans le blanc, le jaune ou la chambre à air de l'œuf, tandis que d'autres déposaient sur l'embryon une goutte de la solution à étudier. Dans le but de faciliter l'étude de certains problèmes de tératogenèse, nous avons mis au point une autre technique permettant de réaliser des injections localisées à des ébauches embryonnaires déterminées et fait construire un appareil dont nous allons donner la description et le mode de fonctionnement.

## DESCRIPTION DE L'APPAREIL

Cet appareil (Fig.) repose sur une planche horizontale et comporte différentes parties:

1. Une seringue (*S*) de 0.25 cm.<sup>3</sup> de capacité et de diamètre extérieur d'environ 2.5 mm. (seringue à huile grise ou à insuline) peut être solidement fixée dans une gouttière métallique sur la planche. Cette gouttière comporte à une de ses extrémités une vis micrométrique au pas de 1 mm., destinée à pousser le piston de la seringue. L'avancement de cette vis est commandé par un vernier gradué en 360 parties.

2. Un tube en cuivre flexible de 1 mm. de diamètre intérieur, long de 25 cm., enroulé en hélice porte un embout soudé à chacune de ses extrémités. L'un peut s'adapter à la seringue solidement grâce à des ressorts de traction, l'autre est luté sur l'aiguille de verre servant aux injections. Cette aiguille longue de 10 à 15 cm. est courbée à 120° vers son extrémité libre et est étirée de manière à débiter 300 à 400 gouttes par cm.<sup>3</sup>

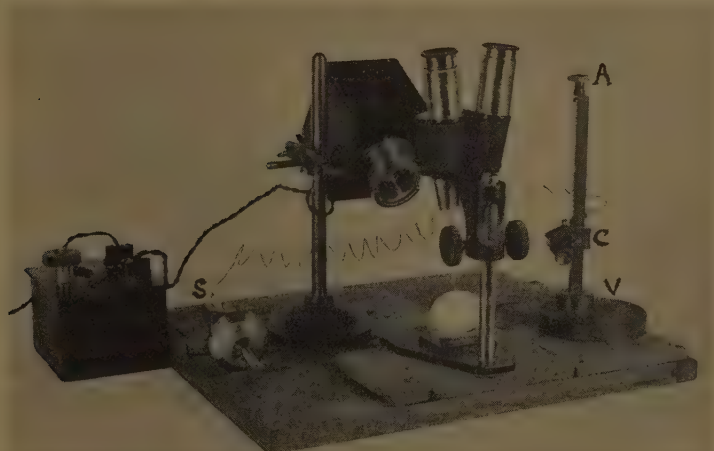
3. Un support vertical (*V*) est muni d'une pièce (*C*) qui peut être déplacée verticalement par une vis micrométrique commandée par le bouton *A*. La pièce *C* sert à fixer l'aiguille de verre dans la position voulue grâce à son inclinaison possible dans le plan horizontal.

4. Une loupe binoculaire.

<sup>1</sup> Authors' address: Institut de Biologie physico-chimique, 13 rue Pierre Curie, Paris Ve, France.  
[J. Embryol. exp. Morph. Vol. 2, Part 4, pp. 290-292, December 1954]



5. Une lampe dont la lumière peut être concentrée sur l'embryon en expérience.



Appareil à injections localisées. Légende dans le texte.

#### FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL

Il comprend la mise en charge de l'appareil et la réalisation de l'injection.

##### (a) Mise en charge

On remplit la seringue *S* de la solution à utiliser et on la fixe dans la gouttière. On fait avancer la vis micrométrique de façon à la mettre en contact avec le piston de la seringue. Le tube flexible et l'aiguille, restés remplis d'eau distillée depuis le lavage de l'expérience précédente, sont d'abord vidés par injection d'air en utilisant une seringue ordinaire. Celle-ci sert ensuite à remplir flexible et aiguille avec la solution à utiliser dont les premières portions servent au rinçage. On monte alors l'embout sur la seringue *S* en veillant soigneusement à ce qu'il ne subsiste aucune bulle d'air dans tout le montage. Pour assurer l'étanchéité complète de l'appareil, indispensable à un fonctionnement régulier, il est nécessaire de graisser, avec de la graisse à rodages, le piston de la seringue et son extrémité se logeant dans l'embout. Les effets de capillarité qui feraient remonter le liquide le long des parois de l'aiguille effilée sont empêchés en recouvrant celles-ci d'une très légère couche de silicone.

Un contrôle de la régularité de marche de l'appareil peut être fait de la manière suivante: On place un papier noir sous la pointe de l'aiguille et à l'aide de la vis *A* on établit successivement le contact de l'aiguille avec le papier en différents endroits après avoir chaque fois actionné le piston de la seringue, de façon à faire sourdre une quantité de liquide égale à  $1/24 \text{ mm}^3$ , ce qui, dans

notre montage, correspond à un angle de  $5^\circ$  du vernier, limite d'un fonctionnement correct.

Les différentes gouttes obtenues doivent être égales entre elles et l'aiguille mise en contact avec le papier sans mouvement du piston ne doit pas laisser apparaître de liquide. S'il n'en est pas ainsi, l'étanchéité de l'appareil doit être à nouveau recherchée.

#### *(b) Réalisation de l'injection*

Un orifice circulaire de 2 cm. de diamètre environ a été pratiqué dans la coquille après enlèvement de 2 c.c. d'albumine. L'embryon est ensuite amené en face de l'orifice et examiné à la loupe binoculaire. L'aiguille est inclinée et fixée de manière que sa partie effilée soit orientée perpendiculairement à l'embryon. Cette pointe est amenée au-dessus de l'embryon par déplacement du support *V*, puis au-dessus du point exact à injecter en déplaçant légèrement l'œuf, tandis qu'elle est descendue vers ce point à l'aide de la vis *A*. Le moment où la pointe de l'aiguille touche la petite couche d'albumine qui revêt l'embryon est très facile à observer ainsi que celui où elle atteint la membrane vitelline qui ne doit pas être fortement déprimée. L'injection est faite en actionnant le piston et l'aiguille est relevée lentement sous le contrôle de la loupe.

Quand la substance injectée est colorée comme par exemple avec des solutions de 1/250 à 1/1000 de trypaflavine, on voit apparaître une petite tache arrondie permettant de contrôler pour chaque embryon la localisation de l'injection. On peut ainsi se convaincre du bon fonctionnement de l'appareil.

Les fines aiguilles peuvent, au cours des expériences, être bouchées par de petites particules; aussi est-il indiqué de n'employer que des solutions centrifugées et parfaitement limpides; il l'est aussi après enlèvement de chaque œuf injecté de faire tomber une goutte en actionnant le piston, puis d'en faire apparaître une autre qui sera enlevée à l'aide d'un papier immédiatement avant l'injection à l'embryon suivant. Tout trouble de fonctionnement sera ainsi évité ou signalé.

#### CONCLUSION

L'appareil à injection décrit ci-dessus a été construit à l'Institut de Biologie physico-chimique par Mr. Baton. Le but visé était de localiser avec une grande précision et une grande régularité l'injection d'une très faible quantité d'une solution de substance chimique sur une région embryonnaire. Cet appareil permet cette localisation de  $1/24 \text{ mm.}^3$ , aussi nous paraît-il susceptible de rendre des services dans l'étude de divers problèmes de tératogénèse.

#### SUMMARY

An apparatus is described for injecting very small quantities (minimum of  $1/24 \text{ mm.}^3$ ) on to a localized region of a chick embryo.

*(Manuscript received 3:v:54)*

# Les injections localisées en chimiotératogénèse

par P. ANCEL<sup>1</sup>

*Institut de Biologie physico-chimique, Paris*

AVEC DEUX PLANCHES

## INTRODUCTION

NOUS avons recherché, depuis 1938, en collaboration avec Mme Lallemand, l'effet tératogène de nombreuses substances chimiques en déposant sur l'embryon, après 16 à 48 heures d'incubation, une goutte de la solution à étudier (Ancel, 1950). Ces injections générales de 1/20 c.c. s'étalent sur tout l'embryon; elles ont mis en évidence l'ébauche électivement sensible à chacune des substances chimiques tératogènes étudiées, mais elles ne permettent pas de découvrir toutes les ébauches sensibles à une même substance et de produire toutes les malformations que chacune de ces substances est capable de faire apparaître, parce que la dose nécessaire pour léser certaines d'entre elles est supérieure à celle qui détermine la mort prématurée de l'embryon, avant que le diagnostic de la malformation puisse être posé avec sécurité. Des injections localisées de très petits volumes d'une solution concentrée nous ont ainsi semblé pouvoir mettre en évidence certains faits que les injections générales ne permettaient pas de découvrir.

L'appareil utilisé pour effectuer ces injections localisées a été décrit précédemment ainsi que son mode de fonctionnement (Ancel & Houget, 1954). Nous exposerons ici certains des résultats obtenus pour montrer leur utilité dans l'étude de différents problèmes intéressant le développement de l'embryon de Poule. Ils concernent: (1) la détermination de la dose tératogène; (2) l'étude des mécanismes de l'action tératogène des substances chimiques; (3) l'utilisation de ces substances dans l'étude de la mécanique embryonnaire; (4) la réalisation de certaines malformations: ectrosomie, symélie, exencéphalie.

## DÉTERMINATION DE LA DOSE TÉRATOGENÈ

Lorsque les substances tératogènes sont injectées dans le blanc ou le jaune de l'œuf, il n'est pas possible de connaître la dose qui a pénétré dans l'ébauche dont la lésion est cause de la malformation. Le dépôt d'une goutte (1/20 c.c.) de la solution d'une substance sur un embryon âgé de deux jours ne le permet pas non

<sup>1</sup> *Author's address:* Institut de Biologie physico-chimique, 13 rue Pierre Curie, Paris Ve, France.



plus parce que la majeure partie de cette goutte n'arrive qu'indirectement à l'ébauche par l'intermédiaire de l'aire vasculaire et peut subir auparavant des modifications susceptibles de faire varier son pouvoir tératogène. Les injections localisées sur l'ébauche sensible, si elles sont susceptibles de faire pénétrer directement la solution dans l'ébauche, doivent donc permettre d'établir la dose tératogène avec une meilleure approximation. Les expériences ont été faites avec la colchicine. Les injections générales ont montré que la malformation typique de cette substance est la strophosomie. L'ébauche électivement sensible dont la lésion provoque la malformation est située chez un embryon âgé de 48 heures sur la ligne médiane dorsale, un peu au-dessous du point d'émergence des vaisseaux omphalo-mésentériques (ébauche S). Les injections localisées ont été faites en ce point (Fig. 1 dans le texte). Les solutions utilisées renfermaient toutes

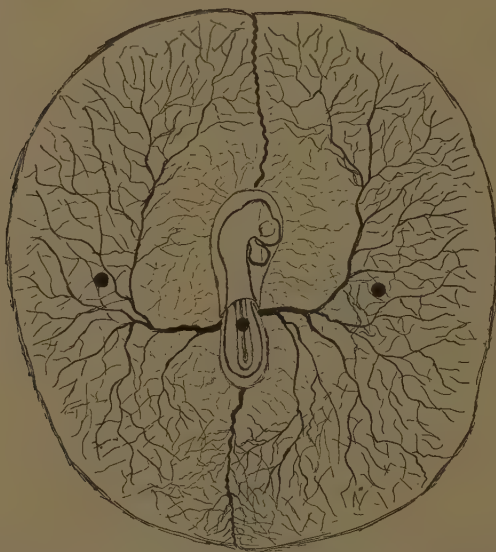


FIG. 1. Schéma d'un embryon avec aire vasculaire après 53 heures d'incubation.

la même dose (0.0125 $\gamma$ ), mais les quantités variaient avec la concentration depuis 1/8 mm.<sup>3</sup> jusqu'à 10/8 mm.<sup>3</sup> Une injection de 1/8 mm.<sup>3</sup> d'une solution de concentration 1 : 10,000 sur l'ébauche S a fait apparaître non seulement des strophosomes mais aussi des ectrosomes caractérisés par l'absence du bourgeon caudal et des membres inférieurs. Cette malformation comporte une lésion plus forte que celle nécessitée pour produire la strophosomie. Trente pour cent d'ectrosomes et 20 pour cent de strophosomes ont été ainsi obtenus. Avec la concentration 1 : 20,000, 11 pour cent d'ectrosomes et 33 pour cent de strophosomes; avec

la concentration 1 : 50,000, pas d'ectrosomes et 27 pour cent de strophosomes; avec la concentration 1 : 100,000, 9 pour cent de strophosomes.

Le pouvoir tératogène d'une même dose (0.0125 $\gamma$ ) diminue donc avec la concentration; ce sont d'abord les ectrosomes qui n'apparaissent plus, ils sont remplacés par des strophosomes, puis le nombre de ces derniers diminue progressivement.

En injection générale, une goutte (50 mm.<sup>3</sup>) d'une solution de concentration 1 : 200,000 donne de 25 à 30 pour cent de strophosomes. La dose injectée est de 0.25 $\gamma$ . En injection localisée, nous avons obtenu la même proportion avec la concentration 1 : 50,000, donc avec une dose de 0.0125 $\gamma$  environ. Avec des concentrations plus fortes, cette même dose a un effet tératogène plus intense (50 pour cent d'ectrosomes et strophosomes avec 1 : 10,000). La même proportion de 25 à 30 pour cent pourrait donc être obtenue avec des doses encore plus faibles. Nous n'avons pas cherché à les établir expérimentalement, notre but étant seulement de montrer les avantages des injections localisées sur les autres techniques pour établir la dose tératogène. Les résultats obtenus suffisent pour montrer que la dose cherchée serait de quelques millièmes de gamma.

#### MÉCANISMES DE L'ACTION DES SUBSTANCES TÉRATOGENÈS

L'augmentation du pouvoir tératogène de la colchicine par concentration de la solution mise en évidence dans le paragraphe précédent peut n'être pas uniquement due au fait de cette concentration, mais à ce que, quoiqu'injectées sur l'embryon, certaines parties de la solution s'étalant sur l'aire transparente et l'aire vasculaire n'amènent à l'ébauche la substance tératogène que par l'intermédiaire du sang, et cela d'autant plus que les solutions injectées sont plus grandes pour une même dose. Des expériences ont été faites pour connaître dans quelle mesure ce facteur pouvait intervenir.

##### (a) *Expériences faites avec la colchicine*

Elles ont consisté à comparer l'effet tératogène obtenu par des injections d'une même solution en égale quantité sur l'ébauche S ou sur l'aire vasculaire. Ces injections ont été faites à des embryons provenant d'œufs incubés pendant 53 heures à 38°. Ils possédaient 26 somites environ, le pli céphalique de l'amnios, facile à repérer au moment de l'injection, se trouvait au-dessus du point d'émergence des vaisseaux omphalo-mésentériques et plus ou moins rapproché de la ligne horizontale coupant en deux parties égales l'espace situé entre ce point d'émergence et la partie inférieure du cœur. La circulation du sang était très active dans une aire vasculaire bien développée (Fig. 1 dans le texte).

Les injections faites à ce stade sur l'ébauche S avec une substance colorée comme la trypaflavine à la concentration de 1 : 250 avec une quantité de 1/8 mm.<sup>3</sup> font apparaître une petite tache ronde dont le diamètre est un peu supérieur à celui de l'ébauche et empiète légèrement sur l'aire transparente. Avec des quantités de plus en plus grandes, l'injection s'étale sur l'embryon et sur

l'aire vasculaire. Des expériences préliminaires ont aussi été faites pour savoir s'il était possible de concentrer une injection de  $1/2 \text{ mm}^3$  sur l'aire vasculaire en l'injectant à égale distance du sinus annulaire et de l'embryon de chaque côté de lui. Les injections de solutions de trypaflavine ont montré que, dans ces conditions, ni l'embryon ni le sinus n'étaient atteints par la tache produite.

Les expériences ont alors été faites en injectant  $1/2 \text{ mm}^3$  d'une solution à 1 : 20,000 sur l'ébauche S d'un lot d'embryons et la même quantité de la même solution à un autre lot sur l'aire vasculaire, une moitié de cette quantité de chaque côté de l'aire vasculaire à droite et à gauche de l'embryon (Fig. 1 dans le texte). Soixante œufs ont été ainsi traités; 49 pour cent de strophosomes ont été obtenus après injection sur l'ébauche S et aucun après injection sur l'aire vasculaire. La concentration utilisée avait été choisie parce qu'elle ne donne pas de morts prématurées (avant le cinquième jour).

Pour connaître d'une manière plus précise la diminution de l'action tératogène par injection sur l'aire vasculaire, de nouvelles expériences ont été faites.

Des solutions de même concentration sont injectées en quantités différentes sur l'embryon et sur l'aire vasculaire. En utilisant une solution de concentration 1 : 10,000 donnant 50 pour cent de malformations (ectrosomes, strophosomes, célosomiens) après injection de  $1/8 \text{ mm}^3$  sur l'ébauche S, on a obtenu 55 pour cent de malformations après injection de  $10/8 \text{ mm}^3$  sur l'aire vasculaire. La quantité de solution injectée doit donc être presque 10 fois plus grande pour produire approximativement le même effet tératogène. Autrement dit, le passage de la colchicine dans le sang diminue son pouvoir tératogène, de 10 fois environ. Ce résultat incite à comparer nos deux techniques d'injection des substances tératogènes.

*(b) Comparaison entre les deux techniques d'injections générales et d'injections localisées*

Lorsqu'on laisse tomber sur l'embryon une goutte ( $1/20 \text{ c.c.}$ ) d'une solution d'une colorant vital après 48 heures d'incubation, on constate que l'embryon et l'aire vasculaire se colorent, mais dans certains cas même lorsque toute faute de technique paraît avoir été évitée (dessiccation après ouverture trop prolongée avant l'injection, embryon pas au centre de l'orifice de la coquille, inclinaison de cet orifice, goutte tombant de trop haut ou pas exactement au centre), une partie seulement de l'embryon et de l'aire vasculaire se colore; en outre, une partie de la solution peut s'étaler en dehors du sinus annulaire sur le blastoderme. Or, comme nous venons de le signaler, les injections faites sur l'aire vasculaire sont moins actives que celles faites sur l'embryon. Celles qui sont localisées au blastoderme le sont encore moins. L'expérience nous a en effet montré qu'en injectant sur le blastoderme, en dehors du sinus annulaire,  $10/8 \text{ mm}^3$  de la solution qui fait apparaître 55 pour cent de malformations en injection sur l'aire vasculaire, on n'obtient aucune malformation.

Les différences dans les résultats obtenus sur les divers embryons d'un même



lot expérimental après injection générale peuvent donc être en partie imputables à la technique. Les injections, localisées à une ébauche embryonnaire, de petites quantités de solution ne comportent pas cette cause d'erreur; faites au contact de la membrane vitelline sous la couche d'albumine, elles diffusent moins et beaucoup plus régulièrement autour du point d'injection. Cette technique des injections localisées apparaît donc comme la meilleure pour mettre en évidence les variations individuelles dans la sensibilité d'une ébauche à une substance tératogène.

(c) *Recherches expérimentales faites avec diverses substances*

Nous avons reproduit les trois variétés d'expériences faites avec la colchicine en utilisant la ricine, la tryptaflavine et une saponine pure blanche (Schuchardt).

1. *Comparaison entre les effets d'une même dose injectée sur l'embryon avec des concentrations différentes au stade de 48 heures.* Les résultats obtenus sont de même ordre que ceux signalés avec la colchicine et montrent l'effet activant de la concentration. Ricine:  $1/8 \text{ mm.}^3$  d'une solution de concentration 1 : 10,000 a donné 65 pour cent de malformations (ectrosomes, strophosomes, célosomiens) et  $10/8 \text{ mm.}^3$  d'une solution de concentration 1 : 100,000 seulement 16 pour cent. Dans les mêmes conditions,  $1/8 \text{ mm.}^3$  d'une solution de tryptaflavine à 1 : 250 a fait apparaître 75 pour cent de malformations (célosomie, anourie, malformation des membres) et 10 pour cent avec  $8/8 \text{ mm.}^3$  d'une solution à 1 : 2,000. Pour la saponine, 90 pour cent de malformations (ectrosomie, strophosomie, célosomie, malformations du bourgeon caudal et des membres) avec  $1/8$  d'une solution à 1 : 1,000 et seulement 8 pour cent avec une concentration de 1 : 8,000.

2. *Comparaison des effets tératogènes produits par l'injection de  $1/2 \text{ mm.}^3$  d'une même solution sur l'embryon et sur l'aire vasculaire.* Les expériences de ce genre faites avec la colchicine sur des œufs incubés pendant 53 heures avaient donné comme résultat 50 pour cent de malformation pour les injections sur l'embryon et 0 pour cent pour celles faites sur l'aire vasculaire. Ces mêmes expériences faites avec nos trois nouvelles substances, chacune sur 50 à 90 embryons, ont donné des résultats de même ordre.

Ricine: solution de concentration 1 : 20,000 injectée sur l'embryon 49 pour cent de malformations et 0 pour cent sur l'aire vasculaire. Pour la tryptaflavine à 1 : 1,000, 71 pour cent contre 0, et pour la saponine à 1 : 2,000, 74 pour cent contre 0.

3. *Comparaison entre les effets tératogènes obtenus avec des quantités différentes d'une même solution.*  $1/8 \text{ mm.}^3$  sur l'embryon (ébauche S) et  $10/8 \text{ mm.}^3$  sur l'aire vasculaire ( $5/8 \text{ mm.}^3$  de chaque côté). La colchicine avait donné 50 pour cent de malformations avec  $1/8 \text{ mm.}^3$  sur l'embryon et 55 pour cent avec  $10/8 \text{ mm.}^3$  sur l'aire vasculaire. Les chiffres correspondants obtenus avec la ricine à la concentration de 1 : 10,000 ont été de 56 contre 49; pour la tryptaflavine, de 66 contre 33 à la concentration de 1 : 400 et pour la saponine de 63 contre 45 à la concentration de 1 : 1,500.

4. *Discussion.* En somme, pour ces quatre substances, le nombre des malformations après injection de  $1/8 \text{ mm.}^3$  sur l'embryon est, sauf pour la colchicine, plus grand que celui des malformations déterminées par l'injection de  $10/8 \text{ mm.}^3$  de la même solution sur l'aire vasculaire, mais les écarts entre les chiffres obtenus diffèrent avec les substances. La comparaison entre eux pour chaque substance fait apparaître, pour les injections sur l'embryon, un excédent en pour cent de 7 pour la ricine, de 33 pour la tryptaflavine, de 18 pour la saponine et une diminution de 5 pour la colchicine.

Une remarque doit tout d'abord être faite au sujet de la saponine. Pour obtenir une proportion de malformations qui ne soit pas inférieure à 50 pour cent avec  $1/8 \text{ mm.}^3$  injecté sur l'embryon, nous avons dû utiliser une concentration de 1:1,500. L'injection de  $10/8 \text{ mm.}^3$  de cette solution a déterminé une lésion de l'aire vasculaire au point d'injection et une rétraction de cette aire autour du point marqué par une tache grise. Cette injection a aussi entraîné une forte mortalité avant le cinquième jour (40 pour cent). Ces morts précoces présentaient pour la plupart des courbures anormales (lordoses et scolioses) et ont été comptés comme porteurs de malformations. Ils présentaient un orifice amniotique adhérent à l'aire vasculaire rétractée. Il est donc possible que ces courbures anormales soient dues à un facteur mécanique et que dès lors la proportion des malformations dues à l'action de la saponine sur une ébauche organique après passage dans le sang soit inférieure à 45 pour cent, chiffre obtenu dans nos expériences. A ce sujet, nous avons cherché à éviter les lésions étendues de l'aire vasculaire dues à la quantité de solution injectée ( $10/8 \text{ mm.}^3$ ). Cette quantité a été réduite à  $1/8 \text{ mm.}^3$  et la concentration augmentée (1:150 au lieu de 1:1,500) pour conserver la même dose. Dans ces conditions nouvelles, les malformations se sont réduits à 27 pour cent. La différence entre les proportions de malformations obtenues après injection sur l'embryon (63) et sur l'aire vasculaire (27) est alors de 36, chiffre un peu supérieur à celui donné par la tryptaflavine.

Il est en outre évident que nos résultats concernant les différences observées entre nos quatre substances au point de vue des modifications de leur pouvoir tératogène après injection dans les vaisseaux sanguins ne peuvent être qu'approximatifs. Pour établir ces différences avec précision, il faudrait réaliser de nombreuses expériences dans lesquelles varieraient les concentrations et les quantités de solutions injectées. Il apparaît cependant que le passage dans le sang ne diminue pas au même degré le pouvoir tératogène de toutes les substances.

Ce résultat peut s'expliquer par une captation de la substance injectée en proportions différentes par l'ébauche dont la sensibilité est recherchée et les autres ébauches organiques. Il peut être dû aussi à une destruction dans le sang des substances injectées, d'intensité variable avec chacune d'elles. Dans le premier cas, les résultats indiqueraient une électivité plus grande de la colchicine pour l'ébauche étudiée que pour les autres substances et dans le second une destruction moins rapide dans le sang.

Quoiqu'il en soit de ces hypothèses, nos expériences nous permettent de conclure que la localisation de l'injection sur une ébauche a augmenté au minimum de près de dix fois le pouvoir tératogène de chacune des substances utilisées par rapport à l'injection sur le réseau capillaire de l'aire vasculaire.

La question se pose alors de savoir si un semblable phénomène se produit avec toutes les substances tératogènes. Certains faits permettent de penser que la réponse pourrait être négative.

L'existence des malformations réalisées en carenant en certaines substances le régime nutritif de la mère chez les Mammifères et de la femelle pondeuse chez les Oiseaux permettent en effet de penser que des substances non directement tératogènes, contrairement à celles que nous avons étudiées, peuvent le devenir en se combinant dans l'organisme avec d'autres, indispensables au développement de certaines ébauches, réalisant ainsi une carence en les détruisant ou les inactivant.

Les travaux de divers auteurs ont pu permettre de poser cette hypothèse. Ackermann & Taylor (1948), cherchant à détruire l'acide nicotinique à l'aide de l'inhibiteur 3-acetylpyridine, ont obtenu des malformations du bec et de la micromélie qu'empêchaient d'apparaître des injections supplémentaires de nicotinamide. Landauer (1948), Zwilling & de Bell (1950), Landauer & Rhodes (1952) ont constaté que ces mêmes malformations produites par l'insuline, l'ésérine et la sulfanilamide pouvaient aussi être empêchées par la nicotinamide, l'acide pyruvique et divers autres corps. L'acide borique produit les mêmes effets tératogènes qui sont empêchés par la nicotinamide et divers composés poly-hydroxylés (Landauer, 1952).

Ces recherches ont été faites en injectant les substances chimiques tératogènes dans le jaune de l'œuf. Les malformations obtenues avec ces substances, quelle que soit la voie de leur introduction dans l'embryon, sont différentes de celles que produisent les substances étudiées par nous dans ce présent travail. Ce sont essentiellement des malformations achondroplasiques semblables à celles qu'ont fait apparaître certaines carences dans la nourriture maternelle.

Dans nos conditions expérimentales, des substances indirectement tératogènes, c'est-à-dire produisant des malformations par carence, ne pourraient agir qu'après passage dans le sang; la comparaison des effets tératogènes obtenus par injection sur l'ébauche sensible et sur l'aire vasculaire permettrait alors de reconnaître ces substances, car, contrairement à celles que nous avons étudiées, leurs effets tératogènes seraient les mêmes que leur solution soit injectée sur l'ébauche sensible ou dans le sang. Mais cette étude présente des difficultés en ce qui concerne la réalisation de bonnes conditions expérimentales. Des expériences semblables à celles que nous avons faites avec nos quatre substances ne peuvent en effet leur être étendues; les limites en étant marquées soit par la solubilité de la substance, soit par le degré d'activité tératogène de  $1/8$  mm.<sup>3</sup> de sa solution.

Nous n'avons donc pas abordé actuellement l'étude de la réalisation des malformations par carence dues à l'injection de certaines substances chimiques. En



ce qui concerne les substances que nous avons étudiées, les malformations qu'elles produisent apparaissent en somme dues à leur pénétration sans transformation préalable dans une ébauche organique et à la sensibilité élective de certaines ébauches pour la substance injectée. Les injections générales et les injections localisées à l'aire vasculaire mettent en évidence l'ébauche hypersensible pour chacune de ces substances et les injections localisées font connaître le degré de cette sensibilité.

Nous allons maintenant rapporter quelques faits concernant l'utilisation des injections localisées dans l'étude d'autres problèmes.

#### LES INJECTIONS LOCALISÉES DANS L'ÉTUDE DE LA MÉCANIQUE EMBRYONNAIRE

Ces injections ont mis en évidence un phénomène de régulation dans le développement de l'amnios et une action de certaines substances chimiques sur la rotation de l'embryon.

##### *(a) Action de la trypaflavine sur le développement de l'amnios*

Le capuchon céphalique apparaît vers la trentième heure de l'incubation et le caudal se forme vers la cinquantième. Ces deux capuchons se rejoignent et se soudent l'un à l'autre vers la soixante-dixième heure à la hauteur des membres inférieurs où a lieu la fermeture temporairement marquée par un petit orifice remplacé par une petite tache blanche. La trypaflavine a été utilisée pour arrêter le développement du capuchon céphalique parce que cette substance agit électivement sur l'amnios comme nous l'avons montré antérieurement à l'aide des injections générales (Ancel, 1950).

Les injections ont été faites à des embryons âgés de 40 à 48 heures ou de 30 à 34 heures. Pour les premiers, l'aiguille de verre a été mise en contact sur la ligne médio-dorsale avec le bord libre du capuchon céphalique. 1/4 de mm.<sup>3</sup> d'une solution à 1 : 1,000 a été injecté. Pour les jeunes stades, l'injection a été faite en avant de la tête ou de chaque côté des vésicules optiques. Les injections ont varié de 1/4 à 1/2 mm.<sup>3</sup> de solutions de concentration 1 : 1,000 à 1 : 3,000 (doses 0.08 à 0.25γ).

Les embryons examinés à la 72<sup>ème</sup> heure de l'incubation montrent, pour la plupart, un orifice amniotique dont la dimension et la situation varient avec les individus. La limite supérieure des plus grands orifices se trouve sur la tête et l'inférieure sur l'ébauche des membres inférieurs. Tous les degrés de rapprochement des deux limites supérieure et inférieure du trou amniotique anormalement persistant peuvent se rencontrer. Ces orifices se rétrécissent progressivement dans les jours qui suivent et finissent habituellement par disparaître. A leur place apparaît la petite tache blanche marquant le point de fermeture de l'amnios. Sa situation est très variable et peut se trouver jusque sur la tête. Dans certains cas persiste au cinquième jour un orifice amniotique sur le dos ou même sur la tête de l'embryon. Le membre supérieur droit peut passer au travers. Ces expériences

montrent que l'ampleur du développement du capuchon caudal de l'amnios est déterminée par celle du capuchon céphalique et que le développement normal est uniquement dû à ce que la formation du capuchon céphalique précède celle du capuchon caudal. Elles montrent aussi qu'un développement complet et bien proportionné de l'amnios peut se réaliser grâce à un phénomène régulateur, malgré une déficience obtenue expérimentalement.

*(b) La rotation de l'embryon et l'orientation de l'allantoïde*

L'embryon de Poule, primitivement à plat ventre sur le jaune, exécute autour de son axe céphalo-caudal un mouvement de rotation qui le couche sur le côté gauche. Ce mouvement s'amorce au niveau de la tête, vers la 33<sup>ème</sup> heure de l'incubation, progresse vers la queue et se termine vers la 72<sup>ème</sup> heure.

L'allantoïde apparaît alors que la queue est encore presque à plat et sort par le côté droit de l'embryon.

Des injections de 1/4 à 1/2 mm.<sup>3</sup> de trypaflavine en solution de 1:1,000 à 1:3,000 ont été faites à gauche de la tête d'embryons âgés de 30 à 34 heures. Dans 20 pour cent des cas (13 sur 64), on a observé une rotation de la tête dans le sens inverse de la normale, la région céphalique et la partie supérieure du corps se couchant sur le côté droit. La queue s'est couchée comme normalement sur le côté gauche et l'allantoïde est sortie à droite de l'embryon. De semblables injections ont été faites à la 48<sup>ème</sup> heure à des embryons dont la tête était normalement couchée sur le côté gauche, mais elles étaient localisées à gauche de la queue, à la hauteur des membres inférieures, cette dernière étant encore à plat à ce stade. Dans 16 pour cent des cas, la queue s'est couchée sur le côté droit et l'allantoïde est sortie à gauche de l'embryon (Fig. A, Planche 1). On a ainsi obtenu des embryons tordus dans le sens opposé aux précédents réalisés par une injection à gauche de la tête. Dans chacun de ces deux cas, la rotation en sens anormal peut n'être que temporaire.

Ces résultats confirment que la rotation de la tête et de la queue de l'embryon ne sont pas obligatoirement solidaires l'une de l'autre; ils montrent que l'allantoïde sortie ventralement apparaît à droite ou à gauche suivant le côté sur lequel se couche l'embryon et qu'elle n'est pas un facteur de la rotation de la queue. Nous avons, à ce sujet, observé sept cas démonstratifs dans lesquels l'allantoïde n'était pas sortie comme normalement du côté opposé à celui où l'embryon a couché sa partie caudale. Dans quatre d'entre eux, la tête de l'embryon s'est couchée à gauche comme normalement, mais la queue s'est couchée à droite; l'allantoïde est alors sortie à gauche, mais dans les jours suivants la queue s'est couchée à gauche et l'allantoïde n'a pas suivi le mouvement. L'embryon s'est alors trouvé entièrement couché à gauche mais avec l'allantoïde derrière lui. Dans les trois autres cas, l'inverse s'est produit. La tête s'est anormalement couchée sur le côté droit et la queue sur le gauche; l'allantoïde est donc sortie à droite comme normalement mais dans les jours suivants la queue s'est aussi couchée à droite; l'allantoïde ne participant pas à ce mouvement elle s'est trouvée

derrière l'embryon (Fig. B, Planche 1). L'absence de solidarité entre la position de l'allantoïde et le mode de rotation de la queue ainsi observée montre que cette rotation n'est pas dirigée par l'allantoïde.

L'action des injections localisées sur la formation de l'amnios et la rotation de l'embryon montre que ces injections peuvent être utilisées avec fruit dans l'étude de la mécanique embryonnaire.

#### MISE EN ÉVIDENCE DE LA SENSIBILITÉ DE CERTAINES ÉBAUCHES À SUBSTANCES CHIMIQUES

Lorsqu'on fait pénétrer dans l'embryon une substance chimique électivement tératogène, soit par injection générale, soit par injection localisée sur l'aire vasculaire, on met en évidence la sensibilité de certaines ébauches organiques pour cette substance. Avec une faible dose, une seule ébauche est lésée et donne une malformation dite typique. Avec de plus fortes doses, certaines autres ébauches sont aussi lésées et donnent des malformations dites secondaires. D'autre part, plus la dose s'élève, plus le nombre des morts précoces augmente. Avec des doses tuant en 48 heures la plupart des embryons, on voit quelquefois apparaître certaines malformations indiquant que la dose nécessaire pour les obtenir est voisine de la dose létale. Le nombre des malformations secondaires apparaît donc limité par la sensibilité à la substance des ébauches dont la lésion amène la mort (cœur et sang). Les injections localisées à diverses régions embryonnaires devront donc permettre d'obtenir avec une substance donnée des malformations qu'elle produit rarement ou même jamais en injection générale mais à la condition que la dose utilisée soit inférieure à la dose létale. Voici trois exemples de la réalisation de malformations par ce procédé, l'ectrosomie, la symélie, et l'exencéphalie.

##### (a) *Réalisation de l'ectrosomie*

L'ectrosomie, caractérisée par l'absence de la partie inférieure du tronc, n'est apparue que très rarement dans nos expériences d'injections générales et seulement avec quelques rares substances. À l'aide d'injections localisées, nous avons obtenu cette malformation avec quatre substances: la colchicine à la concentration de 1 : 10,000 en a donné 87.5 pour cent, le cacodylate à celle de 1 : 10, 66.6 pour cent, la trypaflavine à 1 : 250, 83.3 pour cent et la saponine pure Schuchardt à 1 : 500, 62.5 pour cent. Les injections ont été faites après 48 heures d'incubation sur la ligne médiane dorsale à égale distance de l'extrémité de la queue au point d'émergence des vaisseaux omphalo-mésentériques.

Les ectrosomes obtenus sont morts entre le 7<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour. Ils ne dépassent pas ce stade parce que l'absence de la partie caudale s'accompagne de l'absence de l'allantoïde, mais la partie céphalique est normalement développée. On peut décrire différents degrés de la malformation (Ancel, 1953). Le plus faible est constitué par l'absence de la partie du corps située au-dessous d'une limite rasant le bord supérieur des ébauches des membres inférieurs. Dans le plus fort degré,



les membres ainsi que les parois du corps font défaut, il ne reste que la tête à laquelle se trouvent appendus les organes thoraciques et abdominaux. Le tube digestif persiste bien développé jusqu'au pédicule vitellin; le foie, l'estomac, et la rate n'ont jamais fait défaut (Fig. C, Planche 1).

*(b) Réalisation de la symélie*

L'obtention de cette malformation nécessite la lésion d'une ébauche localisée sur la ligne médiane dorsale, entre les ébauches des deux membres inférieurs. L'arrêt de développement de cette ébauche, s'il est très marqué, amène la fusion des deux membres, donnant ainsi naissance à un membre unique pourvu d'orteils normalement développés (Fig. D, Planche 2). Ce membre unique peut être plus ou moins lésé et former seulement un diverticule pourvu ou non d'orteils minuscules caractéristiques des sirénomèles (Fig. E, Planche 2). La fusion peut enfin ne porter que sur la partie proximale des membres inférieurs qui restent distincts dans leurs parties distales (syméloïdes), accolés l'un à l'autre ou séparés avec ou sans lésion (Fig. F et G, Planche 2).

Les syméliens ont ainsi pu être rangés en trois groupes: symèles, sirénomèles et syméloïdes. Ceux que nous avons obtenus forment une série allant des syméloïdes à deux membres écartés aux symèles parfaits. Certains peuvent arbitrairement être rangés dans le premier ou le deuxième groupe et d'autres dans le deuxième ou le troisième.

Pour obtenir la symélie par injection localisée, nous avons d'abord utilisé la colchicine (Ancel, 1951). Lorsque cette substance arrive à l'embryon âgé de 48 heures par injection dans le sang de l'aire vasculaire de nombreux strophosomes peuvent apparaître, mais pas de symèles quelles que soient les doses utilisées. L'augmentation des doses nécessaires pour produire la strophosomie n'aboutit qu'à la mort trop prématurée des embryons pour permettre un diagnostic de symélie. Les injections générales faites après 34 ou 48 heures d'incubation ont seulement fait apparaître dans quelques cas un accolement entre les deux membres inférieurs relevés sur le dos chez des strophosomes et permettant à la rigueur de les ranger dans les syméloïdes.

Les injections localisées ont été faites après 34 à 48 heures d'incubation. La quantité injectée a été de  $1/4 \text{ mm.}^3$  de solutions de 1:10,000 à 1:100,000 de colchicine. Nous avons obtenu 13 syméliens: 4 symèles, un sirénomèle et 8 syméloïdes dont 4 à membres accolés et 4 à membres écartés. Le plus âgé des symèles est mort à 18 jours et le plus âgé des syméloïdes à 10 jours. Nous avons ensuite cherché à obtenir la symélie avec d'autres substances. Elles ont été utilisées dans les mêmes conditions expérimentales que la colchicine. Les concentrations ont varié pour la ricine de 1:10,000 à 1:40,000; pour le cacodylate de sodium de 1:10 à 1:30; pour la saponine de 1:1,000 à 1:3,000, et pour la trypaflavine de 1:1,000 à 1:250. Les quantités injectées ont varié de  $1/8$  à  $1/2 \text{ mm.}^3$  Les résultats obtenus ont été résumés dans le tableau 1.

Les résultats avec nos quatre nouvelles substances sont donc égaux ou inférieurs à ceux obtenus avec la colchicine. Au total, 35 syméliens divisés en 12

symèles, 7 sirénomèles et 23 syméloïdes. La proportion des syméliens à un membre obtenus par rapport au total des syméliens a été de 38·4 pour cent pour la colchicine, de 22·2 pour la ricine, de 28·5 pour le cacodylate et de 50 pour cent pour la saponine, au total 34·2 pour cent.

TABLEAU 1

<i>Substances</i>	<i>Nombre d'embryons</i>	<i>% de Syméliens</i>	<i>Symèles</i>	<i>Sirénomèles</i>	<i>Syméloïdes</i>
Colchicine . .	135	9·6	4	1	8
Ricine . .	63	7	0	2	7
Cacodylate Na . .	75	9·3	1	1	5
Saponine S . .	58	10	0	3	3
Trypaflavine . .	65	0	0	0	0

Ce résultat est à rapprocher de celui de E. Wolff (1936) qui, sur le même objet, a obtenu à l'aide des rayons X 9 symèles à un membre sur 33 syméliens, soit 27·2 pour cent.

Quelques autres points nous paraissent en outre mériter de retenir l'attention. Ce sont, d'une part les résultats négatifs donnés par la trypaflavine qui a fait apparaître des célosomiens et des embryons porteurs de malformations des membres mais aucun symélien, d'autre part la difficulté d'obtenir des symèles avec orteils bien développés. Dans deux cas seulement, ce fait a été constaté sur nos cinq embryons rangés dans les symèles et dans la statistique de Wolff on ne trouve que 2 de ces symèles contre 7 sirénomèles. Ces résultats montrent que la sensibilité des ébauches des membres inférieurs est très voisine de celle de l'ébauche dorsale située entre elles et mettent en évidence l'extrême difficulté de localiser l'action d'un agent physique ou chimique sur cette ébauche médiane sans atteindre celles qui la bordent. La réussite d'un symèle complet paraît ainsi due, dans nos expériences, non pas à une localisation exceptionnellement parfaite de l'injection, mais à une sensibilité exagérée chez un individu de cette ébauche médiane par rapport à ses voisines. Pour obtenir une forte proportion de symèles, il semble donc nécessaire de trouver une substance pour laquelle l'ébauche médiane serait plus sensible que les ébauches des membres inférieurs.

Dans ces conditions, nous n'avons pas jugé utile de chercher des conditions expérimentales meilleures pour obtenir une plus forte proportion de symèles avec les substances que nous avons étudiées.

(c) *Réalisation de l'exencéphalie* (Fig. H, Planche 2)

Des injections localisées faites sur la tête au stade de 34 heures nous ont permis d'obtenir des exencéphales. L'absence de la voûte du crâne et de la peau qui la recouvre caractérise cette malformation qui, à notre connaissance, n'a été signalée chez la Poule ni à l'état spontané ni après action d'agents physiques ou chimiques. Chez ces exencéphales, la dure-mère était présente et l'encéphale normalement développé. Certains d'entre eux ont atteint le dernier jour de

l'incubation; ils présentaient le même développement que les témoins. L'exencéphalie a été ainsi obtenue à l'aide de diverses substances: la colchicine à la concentration de 1 : 30,000, la ricine à la même concentration, la saponine S à celle de 1 : 2,000 et la tryptaflavine à 1 : 3,000. Les quantités injectées ont été de 1/8 et de 1/24 mm.<sup>3</sup> Diverses malformations de la tête, symétriques et asymétriques, ont été en outre obtenues. Leur étude sera fait ultérieurement.

Nous tenons cependant à signaler combien il est facile d'obtenir l'exencéphalie pure, malformation symétrique et bien localisée sans aucune autre malformation de la tête, contrairement à ce que nous avons observé pour la symélie.

### CONCLUSIONS

Les injections localisées de substances chimiques à de jeunes embryons de Poule peuvent donner des résultats que ne permettent pas d'obtenir les autres techniques utilisées dans l'étude de certains problèmes de tératogénèse.

#### I. Détermination de la dose tératogène à l'aide de la colchicine

Une même dose injectée sur une ébauche électivement sensible dont la lésion provoque la formation de la strophosomie s'est montrée d'autant plus active qu'elle est contenue dans une plus petite quantité de solvant. La substance injectée paraît donc pénétrer directement dans l'ébauche et son activité être fonction de sa concentration.

#### II. Mécanisme de l'action de quatre substances tératogènes

Trois variétés d'expériences ont été faites avec la colchicine, la ricine, la tryptaflavine et une saponine. Des résultats de même ordre ont été obtenus avec ces quatre substances. La première variété met en évidence l'activation du pouvoir tératogène par la concentration de la dose. La seconde montre que ce pouvoir est plus grand après injection sur l'ébauche embryonnaire sensible que sur le réseau capillaire de l'aire vasculaire, et la troisième amène à cette conclusion que l'augmentation de ce pouvoir est au minimum de près de 10 fois, mais avec des différences de degré suivant les substances. La comparaison des effets tératogènes obtenus par injection sur l'ébauche sensible avec ceux déterminés par l'injection dans le sang pourrait ainsi permettre de classer les substances tératogènes d'après la perte d'activité que leur ferait subir leur passage dans le sang. Elle permettrait aussi de reconnaître les substances non directement tératogènes mais réalisant des malformations en privant l'organisme de substances indispensables au développement de certaines ébauches.

#### III. Les injections localisées dans l'étude de la mécanique embryonnaire

1. Elles permettent de mettre en évidence un phénomène régulateur dans le développement de l'amnios: suppléance du capuchon céphalique par le caudal.

2. Elles agissent sur la rotation de l'embryon et peuvent coucher la tête sur le côté droit, le corps se couchant sur le gauche ou inversement suivant les points où ont été localisées les injections. Certaines d'entre elles montrent que l'allantoïde n'est pas le facteur de la rotation de la partie inférieure du corps.



#### IV. *Mise en évidence de la sensibilité de certaines ébauches à des substances chimiques*

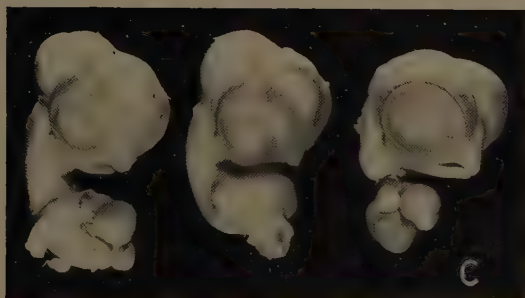
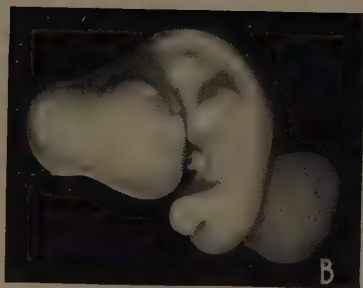
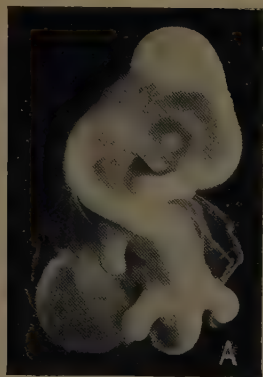
Les injections localisées ont fait apparaître des malformations que ne produisent pas les autres techniques (symélie, exencéphalie) et ont réalisé dans de fortes proportions (80 pour cent) une malformation (ectrosomie) obtenue très rarement par les injections générales. Il apparaît ainsi qu'avec ces injections générales, la sensibilité de certaines ébauches organiques pour une substance chimique est masquée par celle, plus forte, de l'appareil circulatoire dont la lésion entraîne la mort prématurée de l'embryon avant que puisse apparaître la malformation provoquée par l'arrêt de développement de ces ébauches.

#### V. *Valeur des injections localisées*

Ces injections peuvent être utilisées dans deux buts essentiellement différents: la mise en évidence de l'ébauche la plus sensible à la substance injectée et la destruction d'une ébauche déterminée. Dans le premier cas, les injections doivent être localisées à l'aire vasculaire, elles présentent sur les injections générales les avantages que nous avons signalés en comparant les deux techniques. Dans le second cas, les injections obtenues avec notre appareil donnent des résultats dépendant de la concentration de la substance, de la quantité de solution injectée et de la nature de la substance. Les injections effectuées avec des quantités de 1/8 à 1/24 mm.<sup>3</sup> sont supérieures aux agents physiques comme la chaleur, souvent utilisée avec l'aiguille rougeie, le galvano ou le thermocautère, et elles paraissent avoir une valeur égale à celle des faisceaux parallèles de rayons X au point de vue de la localisation. La nature de l'agent utilisé qui ne joue pas avec les agents physiques peut au contraire avoir une grande importance et permet, dans certains cas, d'obtenir des résultats que les rayons X n'ont pas donnés. L'exemple de l'arrêt de développement localisé du capuchon céphalique de l'amnios sans lésion de l'embryon par la tryptaflavine est dû en effet, non seulement à la localisation, mais au fait qu'au stade où l'injection a été pratiquée l'amnios est l'ébauche la plus sensible à la tryptaflavine. La technique de ces injections peut donc progresser dans deux directions différentes, d'une part en utilisant des instruments permettant la réduction de la quantité de solution injectée tout en conservant aux injections leur caractère de régularité, et d'autre part par la découverte de substances tératogènes auxquelles seraient électivement sensibles les ébauches dont on cherche à arrêter le développement sans troubler l'évolution des autres parties de l'embryon.

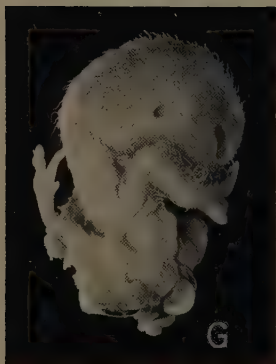
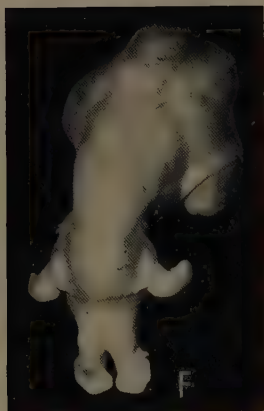
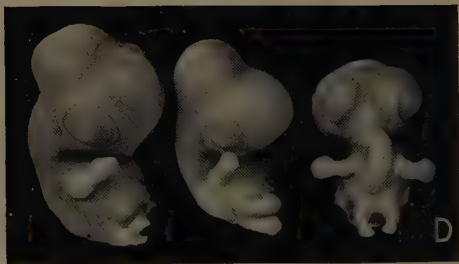
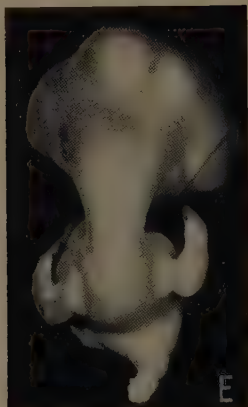
#### SUMMARY

Localized injections of chemical substances on to young chick embryos have provided new data on the determination of the teratogenic dose, on the sensitivity of certain embryonic rudiments, on the mode of teratogenic action of various chemical substances and on certain problems of embryonic mechanisms.



P. ANCEL

*Planche 1*



P. ANCEL

*Planche 2*



## TRAVAUX CITÉS

- ACKERMANN, W. W., & TAYLOR, A. (1948). Application of a metabolic inhibitor to the developing chick embryo. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **67**, 449-52.
- ANCEL, P. (1950). *La Chimiotératogenèse chez les Vertébrés*. Paris: Doin et Cie.
- (1951). Réalisation de la symélie chez l'embryon de Poule par des injections localisées de colchicine. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **145**, 1742-4.
- (1953). Sur différentes variétés d'embryons de Poule ectrosomes obtenus à l'aide d'injections localisées de substances chimiques. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **147**, 942-6.
- & HOUGET, J. (1954). Présentation d'un appareil destiné à faire à de jeunes embryons d'Oiseaux de petites injections localisées de substances chimiques. *J. Embryol. exp. Morph.* **2**, 290-2.
- LANDAUER, W. (1948). The effect of nicotinamide and  $\alpha$ -ketoglutaric acid on the teratogenic action of insulin. *J. exp. Zool.* **109**, 283-90.
- (1952). Malformations of chicken embryos produced by boric acid and the probable role of riboflavin in their origin. *J. exp. Zool.* **120**, 469-508.
- & RHODES, M. B. (1952). Further observations on the teratogenic nature of insulin and its modification by supplementary treatment. *J. exp. Zool.* **119**, 221-61.
- WOLFF, E. (1936). Les bases de la tératogenèse expérimentale des Vertébrés amniotes d'après les résultats de méthodes directes. *Arch. Anat., Strasbourg*, **22**, 1-375.
- ZWILLING, E., & DE BELL, J. (1950). Micromelia and growth retardation as independent effects of sulfanilamide in chick embryos. *J. exp. Zool.* **115**, 59-81.

## EXPLICATION DES PLANCHES

## PLANCHE 1

FIG. A. Embryon âgé de 6 jours, tête couchée à gauche, partie caudale à plat, allantoïde gauche. Le capuchon céphalique de l'amnios est au-dessus des membres supérieurs, pas de capuchon caudal. Trypaflavine: 1:2,000.

FIG. B. Embryon âgé de 5 jours, couché sur le côté droit avec allantoïde à droite. Trypaflavine 1:2,000.

FIG. C. Trois ectrosomes âgés de 8 jours. A gauche, célosomien dont les membres sont dirigés vers le dos (colchicine). Au milieu, malformation des membres supérieurs réduits à une petite saillie pointue (cacodylate de sodium). A droite, tête à laquelle est appendu un paquet d'organes, pas de parois du corps ni de membres ni d'amnios (trypaflavine).

## PLANCHE 2

FIG. D. Trois syméliens obtenus avec la colchicine. A gauche, embryon âgé de 8 jours avec un membre bifurqué. Au milieu (7 jours) deux membres soudés. A droite (6 jours) deux membres cartés.

FIG. E. Symélien à un membre avec orteils rudimentaires, âgé de 9 jours, obtenu par la aponine.

FIG. F. Syméloïde à membres séparés dans leur partie distale, âgé de 7 jours, obtenu à l'aide de la ricine.

FIG. G. Symélien à un membre pourvu de trois orteils, âgé de 18 jours, strophosome obtenu avec la colchicine.

FIG. H. Exencéphale âgé de 19 jours. Trypaflavine 1:1,000. 1/24 mmc. après 34 heures d'incubation.

(Manuscript received 3:v:54)

# Fecundity and Embryonic Mortality in Pigs

by J. S. PERRY<sup>1</sup>

*Laboratory of the Agricultural Research Council, Compton, Berks.*

---

## INTRODUCTION

NEARLY all of the material described in this paper was obtained in the course of a survey undertaken by the writer jointly with Mr. R. W. Pomeroy, and carried out at the Animal Research Station, Cambridge. The purpose of the survey was to obtain information about the breeding performance of pigs, particularly sows from a wide variety of commercial herds in East Anglia. The survey was undertaken as a preliminary to further work on prenatal mortality, mortality among young pigs before weaning, the reasons for discard of sows from breeding herds and other problems. In the present account attention is confined to data derived from 863 animals, the reproductive tracts of which were actually examined in the fresh condition after removal from the carcass at the time of slaughter. Something of the history of 365 of them was known and it has thus been possible to relate such data as corpora lutea and embryo counts to the age of the animal or the number of litters she had borne. The records available for some of the pregnant animals included the date of mating. These provided a useful check on the estimation of the gestation age of embryos, which was derived from the Normal Tables and other information available in the literature (Keibel, 1897; Patten, 1948; Warwick, 1928). It was found that the age of an embryo could be judged fairly accurately up to about 45 days *post coitum*.

Sundry abnormalities of the reproductive tract, including a somewhat surprisingly high incidence of ovarian cysts, have been made the subject of a separate study.

Seventeen of the nulliparous animals and a few of the parous ones were bred at the Research Station. The remainder were from commercial herds and their reproductive tracts were made available by the Ministry of Food, through whose co-operation we were also put in touch with the owners. Arrangements were made to inform us week by week of the names of the breeders giving notice of intention to sell sows at the weekly markets (Collecting Centres of the Ministry being situated at the markets) in Cambridge, Ely, Bury St. Edmunds, and Newmarket. As the collecting centres were, at this time, the only authorized channels for the disposal of sows for slaughter the lists included all the sows discarded

<sup>1</sup> *Author's address:* A.R.C. Field Station, Compton, near Newbury, Berks., U.K.

from the farms, of all sizes, in the area, with the exception of animals killed as 'casualties', i.e. animals slaughtered at short notice, usually because of accidental injury which would not render the carcass unfit for human consumption but might entail suffering or the death of the animal if it were retained while the usual procedure was followed. The seller received less for the carcass, and relatively few animals were involved. Ordinarily we were able to communicate with the breeders before the animals left the farm and many of the breeders co-operated by supplying, sometimes in considerable detail, information about the animals. It was not possible to collect and examine the reproductive organs of all the sows, but no conscious selection was exercised. Usually it was possible to examine all the animals in one entry if the entry could be dealt with at all. The Ministry of Food co-operated further by arranging, whenever possible, to have the sows killed at slaughter-houses within reach of Cambridge. The carcasses were usually examined at the time of slaughter, the reproductive organs being first examined *in situ* and afterwards removed entire. In most cases they were then taken to the laboratory for more detailed examination. The carcasses of 26 gilts were examined in the same way by arrangement with the Hitchin bacon factory.

It should be noted that, except for the few which were bred at the Research Station and those which were slaughtered as 'casualties', these were pigs which were discarded on account of age, sterility, low fertility, poor milk supply, or some other disability, or to make room for another animal in the breeding stock. Yet with the exception of those in which some abnormality could be identified in the reproductive organs there was no evidence of lower fecundity, in the sense of smaller numbers of ova ovulated, among those which were discarded because of apparent reproductive failure, as compared with those which were discarded for reasons unconnected with fertility.

Later experience also suggests that with regard to the aspects of reproduction with which the present account is concerned, these data may be regarded as fairly representative of the present-day pig population of this country as a whole. Great divergences can be demonstrated, however, between pigs kept under different conditions of husbandry (quite apart from breed differences) and it should be remembered that pigs are in fact kept in more diverse conditions than are, for instance, cattle. Thus one cannot fairly take any one herd or any one type of herd as 'typical' and these data, in so far as they are representative of the very widely diverse populations from which they derive, can only be regarded as a rough indication of the average of a population, the various fractions of which may be widely different from each other.

Attention was first drawn to the high incidence of embryonic mortality in pigs by Hammond (1914 and 1921), who described the deaths of embryos in the later stages of gestation (foetal atrophy). The problems were reviewed by Corner (1923). The subject of early embryonic mortality in general was briefly reviewed by Laing (1952). The loss of foetuses at or near parturition in pigs was studied



by Asdell & Willman (1941). Material of the kind described in the present paper does not afford any opportunity for a study of still-births. Indeed, losses at parturition appear to constitute a problem quite different from failures during pregnancy and it may well be that different fractions of the total loss incurred between ovulation and parturition will be found to be quite distinct, arising from breakdowns in different parts of the physiological system which initiates and maintains gestation. Thus losses at different successive stages of gestation are likely to be found to be differently distributed within a pig population, as was the case in rabbits, described by Brambell and others (see Brambell, 1948).

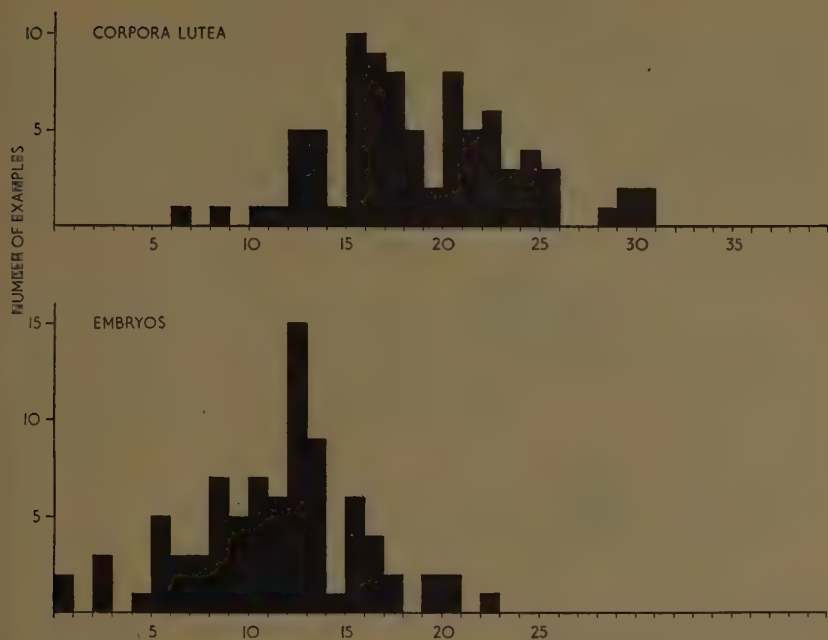
#### METHODS

In the examination of the reproductive tract particular attention was paid to the ovaries. Their condition was noted at the time of autopsy and many were preserved for further study after fixation. Owing to the nature of the material and the varying amounts of information available with respect to different animals, presentation of the observations has been somewhat complicated, since various overlapping fractions of the whole sample have had to be used. Calculations of average litter size, &c., have been made in each case for the relevant group of animals.

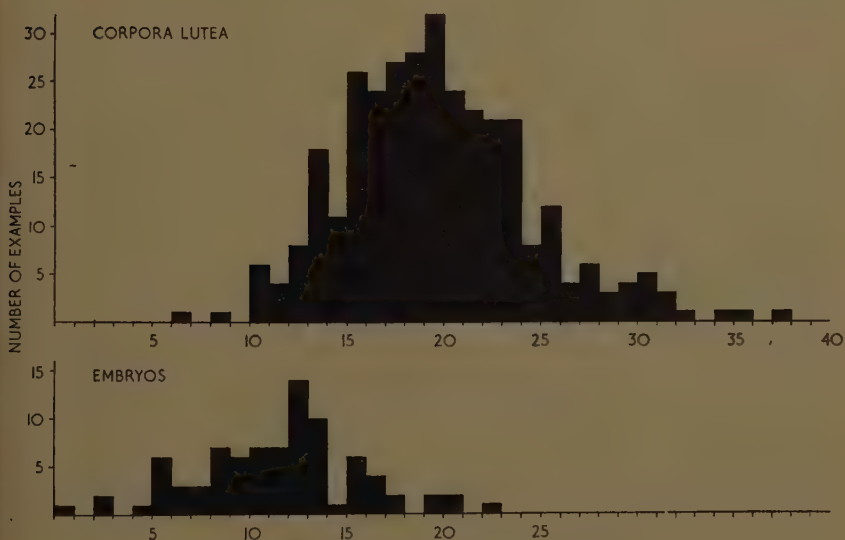
The terms 'gilt' and 'sow' are used here to mean non-parous and parous animals respectively. Thus a female pig is a gilt until the first litter is born.

#### COUNTS OF CORPORA LUTEA AND EMBRYOS

Reliable counts of the corpora lutea were obtained in 352 cases. Their distribution is shown in the histograms in Text-figs. 1-3. The most frequent number of corpora lutea in a pair of ovaries was 20, and the average was 19.6. Very many more sows than gilts were seen, but it is evident that the average number of corpora lutea, here used as an indication of the number of ova ovulated, was significantly smaller among gilts than among sows. It has been shown by other workers that the average litter size at birth increases with successive litters; Carmichael & Rice (1920) found an increase up to the fourth litter. Ellinger (1921) found the increase continued to the sixth litter and similar findings were reported by Johansson (1929). Ellinger's figures, which relate to a homogeneous sample of pigs from a pedigree herd, show an average litter size approximating to 9 pigs in first litters, 10 in second litters, 11 in third litters, and 12 in fourth litters. The average remained almost unchanged between the fourth and eighth litters, but maximum fecundity, as indicated by the inflexion in a curve fitted to the data, occurred at a point corresponding to '6.5' litters. After the eighth litter there was a more pronounced decline in the average litter size. In the present material the animals in which reliable counts of the corpora lutea were obtained included 27 gilts and 93 sows where the number of litters previously borne was known. The data are summarized in Tables 1 and 2. In general, the sows which have had

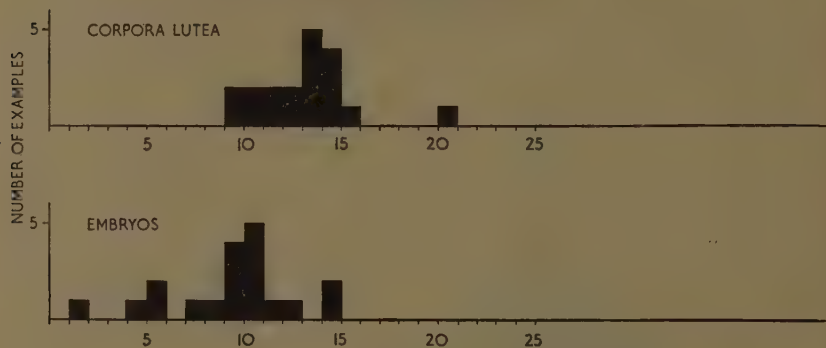


TEXT-FIG. 1. Frequency distribution of corpora lutea and embryos in all animals in which they were counted.



TEXT-FIG. 2. Corpora lutea and embryos in sows.

more litters are older sows, a fact which has to be borne in mind in studies of this kind since potential fecundity is, at least in part, a function of age. It will be seen from Table 1 that there is a marked increase in the average number of corpora lutea after the first litter, and a subsequent upward trend with no apparent decrease in sows which have borne seven litters or more. The increase after the first litter parallels the increase in litter size (pigs born) recorded by Ellinger.



TEXT-FIG. 3. Corpora lutea and embryos in gilts.

TABLE 1

*Number of corpora lutea in relation to number of previous litters*

	Number of previous litters							
	0 (gilts)	1	2	3	4	5	6	7 and over
No. of examples	27	14	20	17	12	6	8	16
Av. No. of c.l.	13.6	18.6	18.8	21.8	21.9	19.8	22.6	24.4
Standard error $\pm$	0.44	0.62	0.92	1.30	1.73	1.22	0.77	1.56

There are relatively few data and it will be seen from Table 2 that the range in the number of corpora lutea in a set is extremely wide in the older animals, so that the averages have to be compared with caution. The relatively high average among the oldest sows is nevertheless striking. The average number of corpora lutea in a set in this group is significantly higher than that of the remaining ('younger') parous animals taken together. Applying the same test (using Fisher's table of  $t$ ) to compare the oldest sows with those which had 3–6 previous litters, the value of  $P$  lies between 0.1 and 0.05. Table 2 shows that the increases in the average number of corpora lutea as between (a) gilts and first-litter sows, and (b) sows which had borne, for instance, 3 or 4 litters and those which had borne 7 and more, were brought about by different causes. The former was the result of an increased potential fecundity affecting the generality of the animals in the



sample, while the latter was the result of a tendency for some of the older animals to produce very large numbers of corpora lutea, so that whereas the lower end of the range altered little, the upper end was greatly extended. It is noticeable that the range of the numbers of corpora lutea in gilts and in first-litter sows scarcely overlaps, and in each case the range is relatively compact—strikingly so when it is remembered that the data apply to a very diversified collection of animals.

TABLE 2

*Range of corpora lutea counts in relation to 'litter-order'*

Number of corpora lutea	Numbers of animals which have previously borne the number of litters indicated at the head of each column					
	0 (gilts)	1	2	3	4	5 and over
10-11 . . . . .	6	—	1	1	1	—
12-13 . . . . .	5	—	2	1	—	—
14-15 . . . . .	14	1	1	1	—	2
16-17 . . . . .	1	3	3	2	2	1
18-19 . . . . .	—	5	2	1	1	4
20-21 . . . . .	1	4	7	3	2	6
22-23 . . . . .	—	1	1	3	1	5
24-25 . . . . .	—	—	2	3	3	4
26-27 . . . . .	—	—	1	—	—	3
28-29 . . . . .	—	—	—	1	1	1
30-31 . . . . .	—	—	—	2	—	1
32-33 . . . . .	—	—	—	—	—	1
34-35 . . . . .	—	—	—	—	—	—
36-37 . . . . .	—	—	—	—	1	—
38-39 . . . . .	—	—	—	—	—	1

It would be extremely interesting to have corpora lutea counts for successive litters in a homogeneous group of pigs, comparable with those for which Ellinger recorded the litter size at birth. Even so, interpretation of the data would be complicated by the difficulty of distinguishing between the effects of age, body-weight, and breeding history. In material of the present sort there is the additional complication of possible sampling errors due to selection in the course of normal farming practice. It is usual to take little account of the first litter, however, in selecting stock for breeding, so that the increase in fecundity after the first litter is in all probability a physiological reality. Studies of the number of young born (Carmichael & Rice, 1920) show that this increase is not simply a function of age or body-weight. Selection might be expected to account for some of the further rise in the average number of corpora lutea with successive litters, as sows of lower fecundity are discarded, but the figures in fact appear very similar to such data as those of Ellinger, obtained from animals where such selection did not operate. The reason for this apparent absence of selection for fecundity in the present material is probably that such selection, as a reason for

discard, is masked by the much greater frequency of other reasons, especially among the smaller herds from which a great proportion of these animals were obtained.

With regard to the maintenance of a high potential fecundity into old age in the present material, it is to be regretted that comparable figures for the number of young born, among the same or similar animals, are not available. It seems unlikely, however, that the production of large litters by old sows would go unnoticed by breeders; the inference is that there is a higher incidence of prenatal mortality among the embryos of old sows. That this is likely to be the case is shown later in the present paper, for it will be shown that larger litters tend to experience a disproportionately higher incidence of prenatal mortality, and it has already been shown that the higher average number of corpora lutea produced by old sows is largely attributable to the production of exceptionally large numbers by some individuals. A more than proportionately high mortality within such litters would prevent the average number born from rising as the average number of corpora lutea rises. This factor alone, however, would not depress the average number born below the level reached in earlier litters. Therefore, if these sows did produce fewer young per litter in later life, as has been found generally to be the case, the likelihood is that there exists a relationship between embryonic mortality and age over and above that which is associated with changes in the average number of ova ovulated. Such a relationship was not observed in a study of embryonic mortality in the wild brown rat (Perry, 1945) where body-weight was taken to be indicative of age, but it may well be that such animals do not frequently live to an age corresponding with that of a sow which has produced some seven litters. The subject is referred to again later in the present paper (p. 320).

#### INTRA-UTERINE MORTALITY

Reliable counts of embryos were obtained from 85 sows and 19 gilts. The numbers ranged from 1 to 23 in sows and 2 to 15 in gilts, the averages being

TABLE 3

*Corpora lutea and embryos in 102 pregnant animals*

	Range	Mean	Standard error
Gilts: (a) c.l. . .	2-21	13.63	0.56
(b) Emb. . .	2-15	9.79	0.73
Sows: (a) c.l. . .	7-31	19.25	0.53
(b) Emb. . .	1-23	11.94	0.49

11.9 and 9.8 respectively. Both corpora lutea and embryos could be counted accurately in each of these 19 gilts and in 83 of the sows, the results being shown in Table 3.

The data do not allow of a complete analysis of intra-uterine mortality, but they do provide some interesting information about it. The principal limitations are the lack of information about litters which are lost in entirety and about the incidence of loss at parturition. Furthermore, there is no means of distinguishing between loss of ova before they are fertilized and loss of embryos as morulae or blastocysts soon after fertilization. This, however, does not apply only to this type of data, for it would be difficult to make this distinction even in experimental animals sacrificed for the purpose. Some of the 31 gilts and most of the 133 sows which were known to have been mated before slaughter were known to have been so only because they were in fact pregnant when killed. There is, therefore, no means of determining 'fertility' in the sense of the average number of services per conception, or of estimating the proportion of animals which lose the whole litter after conceiving. It is, however, possible to analyse the distribution of the loss of ova in animals which did become pregnant and in which some of the embryos survived up to the time of observation. In the first place there is the difference in the proportion of ova lost in gilts and sows as shown in Table 3. This difference relates to the average number and proportion of ova lost in first pregnancies, as compared with the corresponding figures for subsequent pregnancies regardless of age, the ordinal number of the litter, its size, or the stage of gestation. It has been shown that litter size is related to the ordinal number of the litter, and it will be shown that intra-uterine mortality is not randomly distributed with regard to litter size. These factors will be considered later; it is interesting in the first place to compare the incidence of intra-uterine mortality in gilts and sows killed at comparable stages of pregnancy. The embryos first become easily countable in most cases at 16 or 17 days *post coitum*

TABLE 4  
*Embryonic loss in animals 17-40 days pregnant*

	No. of examples	Total No. of c.l.	Av. No. of c.l.	Total No. embryos	Av. No. embryos	% loss
Gilts . .	15	199	13.27	159	10.60	20.1
Sows . .	37	752	20.33	475	12.84	36.9

and the data given in Table 4 are from animals killed between the 17th and 40th days of pregnancy. This is a sufficiently wide range to include a fairly substantial number of animals, and it will be shown later that there is relatively very little embryonic loss during this part of the gestation period.

The numbers of corpora lutea and embryos were equal (i.e. there was no evidence of loss of ova) in 5 out of 19 pregnant gilts and in 4 out of 83 pregnant sows. These gilts and sows make up the 102 pregnant animals in which corpora lutea and embryos could be reliably counted. One of the gilts, here included among the five with 'no loss', had 14 corpora lutea and 15 embryos, about 30



TABLE 5

*The loss of ova in relation to the initial size of the litter (No. of c.l.). In brackets the number of gilts contributing to the total number in each class*

	No. of ova lost													Totals								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		13	14	15	16	17	18	19	20
9	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
10	2(2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2(2)
11	1(1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3(2)
12	2(1)	2(1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3(2)
13	2(1)	—	1	2(1)	—	—	1	—	—	1(1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7(2)
14	—	—	1	1(1)	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10(4)
15	—	—	1	—	1(1)	2(2)	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4(3)
16	—	—	—	5	1	2	1	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11(1)
17	—	1(1)	—	2	3	1	1	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9
18	—	—	—	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	8
19	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	5
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2(1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
21	1	—	—	1	1	1	1	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9(1)
22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
23	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6
24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	2
25	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	4
26	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3
27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
																						99 (17)

No. of corpora lutea

days *post coitum*. Whether this was a case of polyovuly or of 'twinning' could not be determined.

#### EMBRYONIC LOSS IN RELATION TO INITIAL SIZE OF LITTER

When comparing gilts and sows with regard to embryonic loss, allowance must be made for the larger average size of litter in the sows and for the ovulation of very large numbers of ova which often occurs in older animals. In the examination of the present data the discrepancy between the number of corpora lutea and the number of apparently healthy embryos is referred to as the embryonic loss, on the assumption that the number of corpora lutea corresponds to the number of ova ovulated. The formation of 'accessory' corpora lutea during pregnancy, the early regression of some of the corpora lutea of pregnancy, the release of more than one ovum from a single follicle (polyovuly), and twinning, are factors which may affect this assumption. During this investigation no proof of the formation of 'accessory' corpora lutea or early regression of some of the corpora lutea of pregnancy was obtained. In the 102 pregnant animals in Table 3 all the corpora lutea in each pair of ovaries were identical in age so far as could be seen. Polyovuly and twinning could only be recognized when the number of surviving embryos exceeded the number of corpora lutea, as it did in one case. This was one of nine animals in which the number of embryos was not less than the number of corpora lutea. Any of the other eight may have resulted from a loss of embryos balancing an excess of ova, and of course the loss experienced by the remaining animals may have been greater than that here recorded, for the same reason. The magnitude of such errors, however, is not thought to be such as to invalidate the conclusions stated below.

Counts of corpora lutea and embryos in 99 of the animals are set out in Table 5, and the 'proportion of ova lost' in successive grouped litter-size classes is

TABLE 6

*The proportion of ova lost in relation to number of corpora lutea*

<i>No. of c.l. in both ovaries</i>	<i>No. of examples</i>	<i>Total No. c.l.</i>	<i>Av. No. of c.l.</i>	<i>Av. No. of surviving embryos</i>	<i>Proportion of ova lost</i>
9-14 . . .	26	329	12.7	9.4	0.26
15-17 . . .	24	389	16.2	11.5	0.29
18-21 . . .	24	468	19.5	12.1	0.38
22-31 . . .	25	625	25.0	14.4	0.42
Totals . . .	99	1,811	18.3	11.8	0.35

shown in Table 6. Three cases of early pregnancy with very few surviving embryos have been omitted because they were probably cases where the whole litter would be lost, and the majority of such cases are bound to have escaped the sampling. It is seen by inspection of the data in Table 5 that there is a tendency for animals in the lower litter-size classes to lose fewer ova than the

average for the whole sample, while a disproportionately high incidence of loss occurs among the larger litters. Another striking feature of the data is the number of examples where all the ova ovulated appear to have survived to the time of observation. There are nine such cases, compared with four with a loss of one, and five with a loss of two ova. In fact the ratio of loss to litter size is not only not constant but is evidently not a linear relationship. The significance of the divergence of the observed data from what would be expected if the risk of loss which occurred in the sample as a whole applied equally to any individual ovum within the sample, is best demonstrated by the application of the  $\chi^2$  test. This has been done both for the 99 animals ranked individually and for the grouped data shown in Table 6. In the former case  $\chi^2 = 305$ , and in the latter, 34.5. In both cases, entered with the appropriate number of degrees of freedom,  $P = < 0.001$ .

The greater fecundity of sows as compared with gilts has already been described, and Table 4 shows the proportion of ova lost to be greater in sows than in gilts over a comparable part of the gestation period. It will be seen from Table 5 that as far as can be ascertained from the present material there is no reason to suppose that the higher incidence of embryonic mortality in sows is other than can be accounted for by their larger litters.

The influence of the initial litter size upon the average proportion of ova lost is a factor which must be taken into account in any study of embryonic mortality in the pig. In the present paper it has already been mentioned in relation to the incidence of embryonic mortality in successive litters, and it will be referred to again in the following section, dealing with embryonic mortality in relation to the stage of gestation. At present it is only possible to apply to the data from any group of animals a correction factor derived from that particular group, or alternatively to select material or method such that this complication does not arise. There is as yet no clear indication of the nature of the physiological processes involved.

#### EMBRYONIC LOSS IN RELATION TO STAGE OF GESTATION

Counts of corpora lutea and apparently healthy embryos in 61 pregnant animals killed before the 50th day of gestation showed an aggregate loss of 391 ova out of 1,139 ovulated, i.e. 34.4 per cent. Similar counts from 37 animals killed between the 50th day and full term showed a loss of 260 out of 646, i.e. 40.25 per cent. If these groups are comparable in other respects, then 85 per cent. of the total loss found in the second group must have occurred before the 50th day *post coitum*. The litters involved were fairly evenly distributed within the age-groups and the average within each group was near the central value for the group (approximately 27 days and 77 days *post coitum*). The age of embryos was determined from known dates of mating in some cases, and in other cases by comparison with the known series, with the help of information available in the literature (see p. 308). The figures must be interpreted with caution since the



degree of scatter is great and the numbers in the sub-samples are not large, but the estimates that have been made are all minimal in that the loss of whole litters has been ignored of necessity and all embryos have been included among the 'apparently healthy' unless very obviously otherwise. It is evident that the loss of ova in the sample as a whole, from ovulation to parturition, is of the order of at least 40 per cent., and that much the greater part of the loss is sustained before half term.

The method of analysis just described can be extended somewhat, but further subdivision of the sample is limited not only by the numbers available but by the fact that the embryos cannot usually be counted with confidence before the 16th or 17th day of gestation. There were 28 animals with embryos which could be counted and which were between 16 and 24 days *post coitum*. The age of the embryos could be assessed with confidence in most cases; the date of service was known in many and the remainder could be aged by comparison with them and by reference to the literature. These 21 animals, together with 33 between the 24th and 50th days of gestation, make up the 61 referred to in the preceding paragraph, and the 37 between 50 days and full term constitute the third group in Table 7.

TABLE 7

*Embryonic loss in animals at different stages of gestation*

<i>Stage of gestation</i>	<i>No. of examples</i>	<i>Total c.l.</i>	<i>Total emb.</i>	<i>No. of ova lost</i>	<i>Aggregate percentage loss</i>	<i>Av. No. surviving embryos</i>
16-24 days	28	535	358	177	33.1	12.8
25-49 days	33	604	390	214	35.4	11.8
50 days plus	37	646	386	260	40.3	10.4

Thus, in the sample as a whole (i.e. taking gilts and sows of all ages together), of every 1,000 ova ovulated in litters of which some at least of the embryos survive the early stages of pregnancy, about 330 may be expected to be lost before the 25th day of gestation and about 350 (only a further 20) before the 50th day. About 400, probably more, will be lost by full term, only about 50 of them after the 50th day. The average initial litter size is 19 or 20. It was 19.1 in the 28 animals between the 16th and 24th days of pregnancy, and 19.6 in the whole available sample, comprising 352 animals. It falls to about 13 before the 24th day, to about 12 by mid-pregnancy, and to about 10 by full term.

The tendency for larger litters to lose proportionately more ova or embryos has already been demonstrated. It is not, unfortunately, possible to determine whether this tendency applies equally to all stages of gestation, since the earlier fractions of the loss cannot be distinguished in individual animals and the data are not sufficiently extensive to allow of the calculation of the divergence from expectation in appropriate sub-samples. The correlation between litter size and

the risk of loss of individual ova, however, appears to be greater than could be accounted for by particularly heavy mortality in large litters in the second half of the gestation period, since it has been shown that the loss incurred then is a relatively small fraction of the whole. This implies that the effect of litter size on embryonic loss is not, in the main, a result of the difficulty of accommodating or maintaining a large number of foetuses in the uterus in the later stages of gestation. There seems to be no reason to suppose that a larger proportion of ova will fail to become fertilized in larger litters, so that the loss probably occurs after fertilization. It would therefore appear probable that a large proportion of the heavy embryonic mortality which is found to occur in the pig is incurred at or about the time of implantation. It is probable that embryonic mortality prior to implantation and that which occurs subsequently are differently distributed with regard to litter size and other factors. Heavy mortality among the embryos of old sows, which has been shown likely to include a fraction which is not attributable to litter size, may be differently distributed in relation to the stage of gestation. If a large fraction of the aggregate loss could be proved to occur at a definite stage of gestation such as implantation, the demonstration would point the way to further investigation of the relations between mother and embryo at this critical stage. If the correlation between the loss of one embryo and the loss of others in the same litter were found to be confined to one stage of gestation, some progress would have been made towards elucidating the mechanism of this effect.

Finally, with regard to the problem of the accommodation of foetuses in late pregnancy, it may be noted that litters of 20 or more at birth are not particularly rare. Litters of this size result from large initial litters which experience less than the average amount of loss for their size, so that even at this high level of fecundity the number of pigs born is limited by factors other than the sow's capacity to accommodate and nourish the foetuses.

#### SUMMARY

1. 863 female pigs, mostly sows discarded from commercial herds in East Anglia and sold for slaughter, were examined when killed and the condition of the reproductive tract was related to the animal's reproductive history when it was known.

2. The most frequent number of corpora lutea was 20, the average 19.6. Nineteen pigs pregnant for the first time (gilts) had an average of 13.6 corpora lutea and 9.8 embryos; 83 in their second or subsequent pregnancies (sows) averaged 19.25 corpora lutea and 11.9 embryos.

3. The average number of corpora lutea (ovulations) rose sharply after the first litter, continued to rise slightly until after the fourth litter, and rose again after the fifth. The initial rise and subsequent upward trend for several litters is similar to what has been recorded elsewhere for the litter size at birth, but the increasing number of ovulations in later life is in contrast with the falling off

which has been observed in the size of the litter at birth. If both occur in the same population, as seems likely, there must be a substantial increase in embryonic mortality in the later litters.

4. The percentage of ova lost between ovulation and the time of observation was greater in parous than in nulliparous animals, but the difference was found to be attributable to the greater initial size of litters in sows, large litters being found to lose proportionately more ova than small ones. Five of 19 gilts and 4 of 83 sows showed no loss of ova. At least 40 per cent. of all ova ovulated are lost before parturition. About 85 per cent. of the loss is incurred in the first half of gestation, and something like three-quarters of it is incurred before the 25th day of pregnancy.

5. It is suggested that most of the embryonic loss probably occurs at or about the time of implantation between the 10th and 20th day. Even in the case of the largest litters there is no evidence of heavy loss in late stages of pregnancy that could be attributed to the sow's inability to accommodate or nourish the foetuses.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Particular thanks are due to Mr. G. Selby of the Ministry of Food for his part in arranging the supply of material, and to other employees of the Ministry for the help described in the Introduction. I am also greatly indebted to Dr. John Hammond, F.R.S., Director of the Animal Research Station, Cambridge, for his advice and encouragement throughout the period when I was working in his research unit, and to Mr. P. H. Leslie for advice on statistical problems. Professor F. W. Rogers Brambell, F.R.S., read the manuscript and I am constantly indebted to him for guidance in the research programme of which this work forms a part.

#### REFERENCES

- ASDELL, S. A., & WILLMAN, J. P. (1941). The causes of stillbirth in swine and an attempt to control it. *J. agric. Res.* **63**, 345-53.
- BRAMBELL, F. W. R. (1948). Prenatal mortality in mammals. *Biol. Rev.* **23**, 370-407.
- CARMICHAEL, W. J., & RICE, J. B. (1920). Variations in farrow, with special reference to the birth weight of pigs. *Bull. Ill. agric. Exp. Sta. No. 226*, pp. 95.
- CORNER, G. W. (1923). The problem of embryonic pathology of mammals, with observations on intra-uterine mortality in the pig. *Amer. J. Anat.* **31**, 523-45.
- ELLINGER, T. (1921). The influence of age on fertility in swine. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* **7**, 134-8.
- HAMMOND, J. (1914). On some factors controlling fertility in domestic animals. *J. agric. Sci.* **6**, 263-77.
- (1921). Further observations on the factors controlling fertility and foetal atrophy. *J. agric. Sci.* **11**, 337-66.
- JOHANNSON, I. (1929). Statistische Untersuchungen über die Fruchtbarkeit der Schweine. *Z. Tierz. ZüchtBiol.* **15**, 49-86.
- KEIBEL, F. (1897). *Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbelthiere*. 1. *Das Schwein*. Jena.

- LAING, J. A. (1952). Early embryonic mortality. *Rep. 2nd int. Congr. Physiol. Path. Anim. Reprod. Artif. Insem.* **2**, 17-34.
- PATTEN, B. M. (1948). *The Embryology of the Pig*. (3rd ed.) Philadelphia: The Blakiston Company.
- PERRY, J. S. (1945). The reproduction of the wild brown rat (*Rattus norvegicus* Erxleben). *Proc. zool. Soc. Lond.* **115**, 19-46.
- WARWICK, B. L. (1928). Pre-natal growth of swine. *J. Morph.* **46**, 59-84.

(Manuscript received 4:iv:54)



# Chlorure de lithium et biochimie du développement de l'œuf d'Amphibien

par R. LALLIER<sup>1</sup>

*Institut de Biologie physico-chimique, Paris*

## INTRODUCTION

DEPUIS la découverte initiale de Herbst, l'ion lithium s'est montré un agent particulièrement efficace dans l'étude de la détermination et de la différenciation. Les savants suédois ont apporté une contribution très importante à l'analyse des effets morphologiques et biochimiques du lithium sur le développement de l'œuf d'Oursin. Raven et ses élèves ont étudié en détail l'action du lithium sur la Limnée. Chez les Amphibiens, les effets du traitement lithiné ont été décrits et analysés, surtout du point de vue morphologique. Nous nous proposons d'examiner ici les effets de l'ion lithium sur la biochimie du développement embryonnaire de la grenouille, *Rana temporaria*.

Rappelant au préalable l'essentiel des contributions apportées chez les Amphibiens, à la morphologie de l'embryon lithiné, nous notons que Leplat (1920), Adelmann (1934), et Töndury (1937) ont étudié les déficiences oculaires et céphaliques. Lehmann (1937) montra le premier que ces déficiences ne se limitent pas aux régions céphaliques, mais s'étendent également aux structures troncales, où l'on peut remarquer une transformation plus ou moins complète du territoire chordal présomptif en somites. Pasteels (1945), dans une étude systématique sur l'œuf de divers Amphibiens, Anoures et Urodèles, a décrit et analysé les hypomorphoses consécutives à l'action du chlorure de lithium.

Le rôle fondamental attribué au métabolisme des glucides au cours du développement embryonnaire, nous a conduit à examiner ce point de vue en détails. Certaines particularités de la dégradation aérobie et anaérobie des glucides chez les embryons lithinés, ont été ainsi mises en évidence.

La glycolyse anaérobie notamment est diminuée chez les embryons lithinés. L'étude de l'action du chlorure de lithium sur des systèmes enzymatiques purifiés impliqués dans la glycolyse, tels que l'hexokinase, l'aldolase, la triosephosphate-déshydrogénase, montre que l'activité de ce dernier enzyme est réduite en présence de chlorure de lithium. La consommation d'oxygène est diminuée chez les embryons lithinés. La valeur du quotient respiratoire n'est pas modifiée. L'activité des systèmes déshydrogénasiques et l'activité du système cytochrome

<sup>1</sup> Author's address: Institut de Biologie physico-chimique, 13 rue Pierre Curie, Paris Ve, France.

— cytochrome-oxydase ont été mesurées, afin de déterminer leur part respective dans l'inhibition de la respiration. Les embryons lithinés présentent une inhibition importante de l'activité de leur système déshydrogénasique.

L'étude de l'utilisation de divers substrats intervenant dans la dégradation aérobie des glucides a donné des résultats particulièrement significatifs, et nous avons pu confirmer par cet ensemble d'observations, à quel point les altérations morphologiques sont liées au métabolisme des glucides.

Lindhahl (1936), a abouti à des conclusions analogues en étudiant l'action du chlorure de lithium sur l'Oursin.

L'effet de l'ion potassium sur la consommation d'oxygène des embryons témoins et lithinés est examiné en corrélation avec l'effet antagoniste de cet ion avec l'ion lithium.

Le fait que la plupart des enzymes responsables du catabolisme aérobie des glucides, et sans doute également la plupart de ceux plus spécifiquement en relation avec le catabolisme anaérobie, soient liés à des particules sédimentables intracellulaires, nous a incité à étudier celles-ci. Utilisant comme critère analytique le pourcentage d'acide ribonucléique fixé à ces particules, nous avons pu montrer, que chez les embryons lithinés, l'ensemble de ces particules, mitochondries et microsomes, perd une fraction notable de son acide ribonucléique.

Certes, l'utilisation des glucides joue un rôle considérable au cours du développement embryonnaire et toute modification de leur métabolisme doit retentir sur l'organogenèse, mais cela n'exclut toutefois pas d'autres interprétations. La littérature biochimique est riche en travaux montrant que les particules sédimentables intracellulaires, en raison de leur constitution enzymatique complexe, constituent un véritable carrefour d'activités métaboliques et le métabolisme des glucides n'en représente qu'une partie. De nombreuses indications nous permettent de penser que la synthèse des protéines s'effectue en relation étroite avec ces particules.

Les réactions fournissant l'énergie se déroulent donc en liaison intime avec les mécanismes spécifiques des synthèses protéiques. Toute atteinte à l'intégrité structurale de ces particules doit retentir sur leurs multiples fonctions et l'on conçoit ainsi que l'élaboration des structures vivantes spécifiques puisse être modifiée par l'action du lithium.

Ces considérations, jointes aux résultats expérimentaux obtenus par l'étude du métabolisme glucidique, nous ont permis d'avancer l'idée que l'ion lithium devrait ses propriétés morphogénétiques à son action sur le système particulaire (Lallier, 1950). Gustafson (1952), Gustafson & Lenicque (1952), dans leurs importantes recherches sur l'activité du lithium chez l'Oursin, aboutissent à une conclusion analogue.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les œufs de l'Amphibien anoure *Rana temporaria* sont utilisés. Les œufs sont dégangués aussitôt après la fécondation par la technique de Bataillon (1912).

La méthode de Spiegel (1951) a également été employée. Pour les mesures manométriques, il est préférable de laisser une mince couche de gangue adhérente à l'œuf. Celle-ci ne gêne pas les mesures manométriques et offre l'avantage de diminuer considérablement la fragilité des œufs.

#### *Traitement au chlorure de lithium*

Les conditions du traitement sont celles décrites par Pasteels (1945). Elles donnent le maximum d'hypomorphoses. Les embryons sont traités au stade blastula avancée, à raison de 50 pour 100 c.c. de solution de LiCl à 9‰ dans l'eau ordinaire, pendant 3 heures à 18° C. Les embryons sont ensuite lavés longuement à l'eau courante. Pour chacune des expériences, les embryons ont été choisis au stade jeune gastrula.

#### *Mesure de la glycolyse anaérobie*

Cinquante embryons sont mis dans une solution de Ringer au 1/10 dans des tubes où l'on fait le vide. Les tubes scellés sont placés dans un thermostat à 22° C., pendant une durée variable selon les expériences. L'acide lactique présent au début et à la fin de l'expérience est dosé par la méthode de Barker & Summerson (1941).

Pour l'étude des enzymes de la glycolyse, l'hexokinase est préparée selon la méthode de Meyerhof (1927) et le test d'activité utilisé est celui décrit par Wajzer (1949). La préparation de l'aldolase et de la triosephosphatedéshydrogénase et les tests d'activité de ces enzymes sont décrits par Cori, Slein, & Cori (1948).

#### *Mesures manométriques*

La méthode de Warburg est utilisée pour la mesure de la consommation d'oxygène. 100 embryons dans du liquide de Ringer au 1/10, occupant un volume total de 5.5 c.c., sont mis dans chaque fiole de Warburg. Le CO<sub>2</sub> est absorbé par 0.2 c.c. d'une solution de KOH à 20 pour cent. La température est de 22° C.

La mesure du quotient respiratoire est effectuée par la méthode de Warburg, utilisant 3 manomètres. Chaque fiole contient 100 embryons. Le CO<sub>2</sub> est déplacé par une solution de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 3N.

L'activité déshydrogénasique est mesurée par la méthode de Quastel & Wheatley (1938). Cinquante embryons sont homogénéisés dans une solution de Holtfreter au 1/10 additionnée de CO<sub>3</sub>NaH (concentration finale 0.025 M). Le volume total de l'homogénat est de 5 c.c. Chaque fiole de Warburg reçoit 2.7 c.c. d'homogénat et le diverticule latéral 0.3 c.c. d'une solution de ferricyanure de potassium M et de CO<sub>3</sub>NaH 0.025 M. Un manomètre de contrôle est utilisé pour la mesure du CO<sub>2</sub> dégagé par l'action de l'acide lactique formé au cours de l'expérience, sur le bicarbonate du milieu. Au début de l'expérience, l'air des manomètres est remplacé par un mélange gazeux comprenant 95 pour cent de N et 5 pour cent

de  $\text{CO}_2$ . Après 10 minutes, l'équilibre de la température étant atteint, on verse la solution de ferricyanure sur l'homogénat. Les lectures sont faites toutes les 10 minutes. L'activité déshydrogénasique est mesurée par la quantité de  $\text{CO}_2$  formée en une heure.

L'activité de la cytochrome-oxydase est mesurée par la méthode de Stotz (1939), utilisant comme substrat l'hydroquinone. 50 embryons sont homogénéisés dans une solution de tampon phosphate M/20 à pH 7.4, formant un volume total de 5 c.c. Chaque fiole de Warburg reçoit 2 c.c. d'homogénat, 1 c.c. de solution de tampon phosphate 0.05 M à pH 7.2 et 1 c.c. d'une solution de cytochrome C (la concentration finale de cytochrome C dans chaque fiole est de  $0.05 \cdot 10^{-4}$  mM. par c.c.). Dans le diverticule latéral de chaque fiole, on met 0.2 c.c. d'une solution fraîchement préparée d'hydroquinone à 3 pour cent dans un tampon phosphate 0.1 M. à pH 7.2. Le  $\text{CO}_2$  formé est absorbé par 0.2 c.c. d'une solution de KOH à 20 pour cent. Pour la correction due à l'autooxydation de l'hydroquinone, on utilise un manomètre témoin contenant 2 c.c. d'homogénat, dont l'activité cytochrome-oxydase a été préalablement détruite par chauffage. La température est de  $25^\circ \text{C}$ . Les lectures sont faites toutes les 10 minutes. L'activité de la cytochrome-oxydase est donnée par la mesure de la quantité d'oxygène consommée en 60 minutes, cette valeur étant obtenue par l'extrapolation des mesures effectuées pendant les 30 premières minutes de l'expérience.

#### *Fractionnement des homogénats et dosage de l'acide ribonucléique*

Cinquante embryons sont homogénéisés à  $0^\circ \text{C}$ . dans une solution de Ringer sans Ca, tamponnée à pH 7.1. Le volume total est de 3 c.c. L'homogénat est centrifugé une première fois pendant 10 minutes à 2,000 tours/minute. Le culot, constitué essentiellement de débris cellulaires et de vitellus, est éliminé. Le liquide surnageant est centrifugé à nouveau pendant 2 minutes à 10,000 tours/minute. Le culot obtenu, contenant les granules de pigment, est éliminé et le surnageant recueilli est ultracentrifugé pendant une heure à 40,000 tours/minute. Ce culot constitué de particules de tailles variées, mitochondries et microsomes, est lavé par remise en suspension dans la solution d'homogénat et ultracentrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le liquide de rinçage est ajouté au surnageant. L'acide ribonucléique est dosé dans le surnageant et dans le culot de matériel sédimenté.

Les caractéristiques de ces centrifugations sont indiquées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

*Caractéristiques des centrifugations utilisées pour le fractionnement des homogénats*

Vitesse (en tours par minute) . . . . .	2,000	10,000	50,000
Rayon au fond des tubes (en cm.) . . . . .	10.5	10.5	3
Force centrifuge (au fond des tubes) . . . . .	50 g.	11,500 g.	80,000 g.
Hauteur de la colonne liquide (en cm.) . . . . .	2	2	2



Nous avons établi le rapport: acide ribonucléique (culot de granules)/acide ribonucléique total (culot de granules + surnageant); et à titre de contrôle le rapport: acide ribonucléique (culot de granules)/N total (culot de granules).

L'acide ribonucléique est extrait au bain marie bouillant par une solution de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  M/5, puis dosé par la méthode de Barrenscheen & Peham (1942).

L'azote est dosé par la microméthode de Kjeldahl modifiée. Les échantillons minéralisés sont distillés dans l'appareil de Markham. Le distillat est absorbé dans une solution d'acide borique en présence d'un indicateur et le titrage est effectué à l'aide d'une microburette de Linderström-Lang, par une solution de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N/20.

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### *Glycolyse anaérobique*

Les résultats sont indiqués dans le tableau 2. Ces dosages sont effectués sur des lots de 50 embryons, mis en anaérobiose pendant une durée variable, selon les expériences. Les embryons lithinés produisent moins d'acide lactique en anaérobiose que les embryons témoins. La différence peut atteindre 50 pour cent.

TABLEAU 2

*Mesure de la glycolyse anaérobique (l'acide lactique est exprimé en  $\gamma$  pour 50 embryons)*

<i>Durée de l'expérience en heures</i>	<i>Témoins</i>	<i>Lithinés</i>
5	195	108
12½	444	346.5
6	144	129
8½	195	94.5
15	226	135

### *Étude de systèmes enzymatiques isolés*

L'effet du lithium sur l'activité in vitro de systèmes enzymatiques isolés (hexokinase, aldolase, triosephosphatedéshydrogénase) a été examiné. Ces enzymes sont préparés selon les procédés maintenant courants à partir de la levure pour l'hexokinase, et du muscle de lapin pour l'aldolase et la triosephosphatedéshydrogénase. L'origine du matériel enzymatique, l'expérimentation in vitro, donnent à ces mesures une valeur indicative utile pour l'interprétation des effets du lithium in vivo sur l'embryon de grenouille.

*Hexokinase.* L'activité de l'hexokinase in vitro n'est pas modifiée en présence de  $\text{LiCl}$  0.2 M, ainsi qu'il ressort de l'examen des courbes de la figure 1.

*Aldolase.* L'activité de l'aldolase est mesurée en dosant le phosphore libéré par l'hydrolyse en milieu alcalin du triosephosphate libéré lors de la réaction:

$d\text{-phosphoglyceraldehyde} + \text{phosphodihydroxyacétone} \rightleftharpoons \text{fructose } 1.6 \text{ di-phosphate.}$

Dans nos expériences, les quantités de P formées sont très voisines lorsque la réaction se déroule en l'absence ou en présence de lithium, à deux concentrations différentes, 0.2 M. et 0.4 M. Dans l'une de ces expériences nous avons obtenu: témoins: 38.4 $\gamma$  de P; LiCl (0.2 M.): 36.8 $\gamma$  de P; LiCl (0.4 M.): 36.8 $\gamma$  de P. L'activité de l'aldolase, *in vitro*, n'apparaît pas modifiée par le lithium.

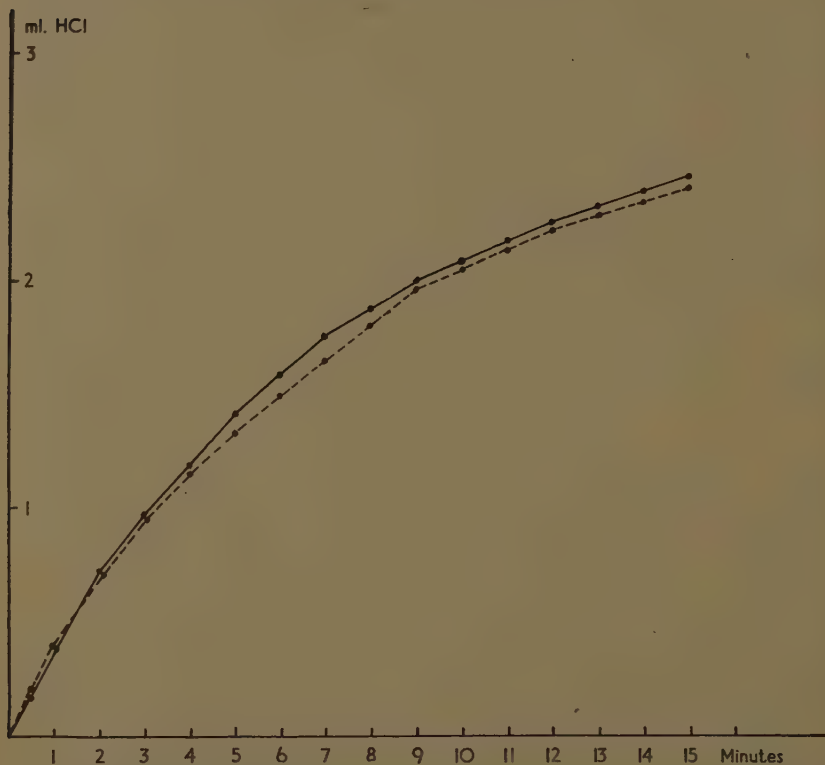


FIG. 1. Action du LiCl sur l'activité *in vitro* de l'hexokinase. Trait plein: témoins; tirets: LiCl (0.2 M.). LiCl (0.2 M.) ne change pas l'activité de l'hexokinase *in vitro*.

*Triosephosphatedéshydrogénase.* Les courbes de la figure 2 font apparaître une diminution de l'activité de la triosephosphatedéshydrogénase en présence de LiCl à la concentration 0.2 M. LiCl (0.4 M.) supprime presque complètement l'activité enzymatique *in vitro*.

#### Consommation d'oxygène

Les courbes de la figure 3 indiquent l'évolution de la consommation d'oxygène chez 100 jeunes gastrulas témoins et lithinées à 22° C. La consommation

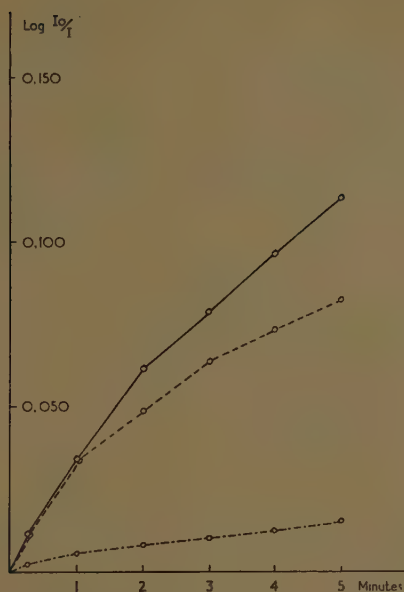


FIG. 2. Action du LiCl sur l'activité *in vitro* de la triosephosphatodéshydrogénase. Trait plein: témoins; tirets: LiCl (0.2 M.); points et tirets: LiCl (0.4 M.). LiCl (0.2 M. et 0.4 M.) inhibe l'activité de la triosephosphatodéshydrogénase.

d'oxygène est inhibée chez les embryons lithinés. En outre chez ces derniers, la pente moins accentuée de la courbe indique un accroissement moins rapide de la consommation d'oxygène, au cours du développement.

### Quotient respiratoire

Le tableau 3 donne la mesure du quotient respiratoire pour 4 expériences distinctes. Le quotient respiratoire des embryons lithinés conserve une valeur analogue à celle des témoins malgré une inhibition importante de la consommation d'oxygène. Bien que l'expérience soit commencée avec des embryons au même stade, la correspondance entre les stades des embryons traités et normaux n'est pas conservée pendant toute la durée de l'expérience, surtout si celle-ci dure assez longtemps, en raison du ralentissement du développement chez les embryons lithinés.

### Consommation d'oxygène en présence de substrats

Nous avons observé précédemment que l'addition au milieu de culture des embryons, de divers substrats intermédiaires de la dégradation des glucides, ne modifie pas les effets de l'ion lithium sur la morphologie de l'embryon. Il est

toutefois intéressant de comparer les effets de ces substrats sur la consommation d'oxygène des embryons normaux et lithinés. A cet effet on a utilisé le lactate, le pyruvate, l'acétate, le cétooglutarate, le succinate, le glutamate, le malate, et

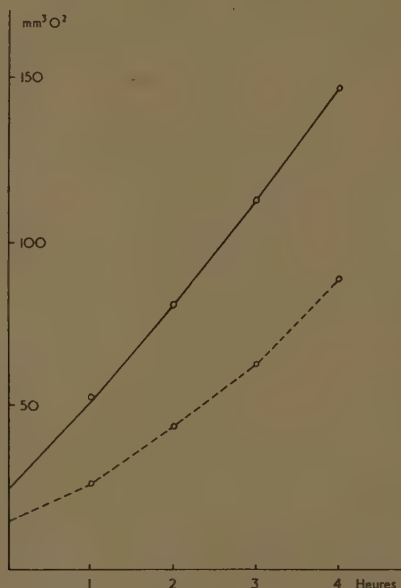


FIG. 3. Consommation d'oxygène de 100 jeunes gastrulas (à 22° C.). Trait plein: embryons témoins; tirets: embryons lithinés. L'accroissement de la consommation d'oxygène est ralentie chez les embryons lithinés.

TABLEAU 3

Mesure du quotient respiratoire (Q.R.) pour 100 gastrulas à 25° C.

Durée de l'expérience en heures	CO <sub>2</sub> dégagé en mm. <sup>3</sup>		O <sub>2</sub> absorbé en mm. <sup>3</sup>		Q.R.	
	Témoins	Lithinés	Témoins	Lithinés	Témoins	Lithinés
6½	168.8	86.2	216.3	106.6	0.78	0.80
12	325.0	169.8	343.0	177.6	0.94	0.95
3	85.5	66.6	84.4	66.6	1.01	1.00
25	584.6	215.6	559.4	203.3	1.04	1.06

le fumarate de sodium. La concentration de ces substrats dans le milieu est de M/50.

Les valeurs de la consommation d'oxygène sont indiquées dans le tableau 4. On remarque que l'addition de substrats provoque chez les embryons témoins un accroissement de la consommation d'oxygène, pouvant atteindre, avec l'acétate notamment, 75 pour cent. Chez les embryons lithinés, la consommation



d'oxygène déjà diminuée, par suite de l'action du lithium, n'est que faiblement accrue, ou diminuée, ou même ne subit pas de modification. Ainsi avec l'acétate notamment, la consommation d'oxygène est accrue d'environ 16 pour cent, chez les embryons lithinés; les embryons témoins montrent avec ce même substrat un accroissement de l'ordre de 75 pour cent. Le plus souvent, la consommation d'oxygène de l'embryon lithiné ne varie pas en présence de substrat (pyruvate, lactate). Elle montre même une diminution, en présence de cétooglutarate, de fumarate et de glutamate.

TABLEAU 4

*Mesure de la consommation d'oxygène en présence de substrats  
(O<sub>2</sub> en mm.<sup>3</sup> par heure pour 100 gastrulas)*

Nature des substrats		O <sub>2</sub> consommé		Variation de O <sub>2</sub> en %
		sans substrat	avec substrat	
Pyruvate de Na	Témoins	24.6	37.7	+53
	Lithinés	19.1	19.1	—
Lactate de Na	Témoins	33.2	43.2	+30
	Lithinés	15.9	15.2	—
Acétate de Na	Témoins	55.5	96.4	+74
	Lithinés	28.2	32.9	+16.5
Cétooglutarate de Na	Témoins	60.9	97.5	+60
	Lithinés	35.2	27.9	—20
Succinate de Na	Témoins	76.3	117.9	+54.5
	Lithinés	39.2	41.2	+5
Fumarate de Na	Témoins	51.6	69.2	+34
	Lithinés	33.8	31.2	—7.6
Malate de Na	Témoins	51.6	66.6	+29
	Lithinés	33.8	34.7	+2.6
Glutamate de Na	Témoins	76.3	124.2	+62.7
	Lithinés	39.2	33.6	—14.2

### *Consommation d'oxygène et ion potassium*

Le rôle antagoniste de l'ion potassium sur les effets morphogénétiques de l'ion lithium d'une part et la relation établie entre le métabolisme glucidique et le potassium d'autre part, nous ont incité à examiner l'effet de ces ions utilisés séparément et simultanément sur la consommation d'oxygène de jeunes gastrulas. A cet effet, les embryons sont laissés respectivement pendant 6 heures à 18° C. dans les solutions suivantes: LiCl 4.5‰; KCl 4.5‰; LiCl 4.5‰ + KCl 4.5‰. La durée du traitement est prolongée en raison de la faible concentration des solutions. Le tableau 5 indique la consommation d'oxygène en mm.<sup>3</sup> par heure pour 100 embryons à 25° C. Il ressort nettement de l'examen des chiffres ci-dessous que le KCl accroît la respiration, tandis que LiCl l'inhibe. L'action combinée de ces deux sels laisse la respiration à son niveau sensiblement normal. L'antagonisme entre les ions K<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup>, déjà signalé dans les études morphologiques, est ainsi confirmé par l'étude de la consommation d'oxygène.

TABLEAU 5

Mesure de la consommation d'oxygène en présence d'ions Li et K  
( $O_2$  en  $mm.^3$  pour 1 heure, pour 100 gastrulas)

	$O_2$ consommé	Variation de $O_2$ en %
Témoins . . . .	27.6	—
LiCl . . . . .	21.4	—22.4
KCl . . . . .	34.4	+24.6
LiCl+KCl . . . .	25.8	—

### Activité déshydrogénasique

Les résultats sont indiqués dans le tableau 6. Il s'agit de l'activité déshydrogénasique globale sur homogénat, sans addition de substrats. La quantité de  $CO_2$  dégagée mesurant dans ce test l'activité déshydrogénasique, on constate que cette activité est fortement réduite chez les embryons lithinés. Cette inhibition est de l'ordre de 25 pour cent.

TABLEAU 6

Mesure de l'activité déshydrogénasique (Méthode de Quastel & Wheatley)

	$CO_2$ dégagé (en $mm.^3$ pour une heure)		Inhibition en %
Exp. I	Témoins	88.6	25.1
	Lithinés	66.3	
Exp. II	Témoins	80.3	29.7
	Lithinés	56.4	
Exp. III	Témoins	85.2	23.2
	Lithinés	65.4	

### Activité de la cytochrome-oxydase

Les résultats de 3 expériences sont consignés dans le tableau 7. L'activité de la cytochrome-oxydase est mesurée par la consommation d'oxygène d'un homo-

TABLEAU 7

Mesure de l'activité de la cytochrome-oxydase

	$O_2$ absorbé (en $mm.^3$ pour une heure)	
Exp. I	Témoins	55.5
	Lithinés	57.15
Exp. II	Témoins	68.45
	Lithinés	70.2
Exp. III	Témoins	89
	Lithinés	98

génat en présence d'un substrat, l'hydroquinone, et d'un excès de cytochrome C. La valeur de la consommation d'oxygène chez les embryons témoins et traités est très voisine; celle-ci est même un peu plus élevée chez les embryons

traités, principalement dans l'expérience III. Il ressort ainsi nettement que le traitement au chlorure de lithium ne diminue pas l'activité de la cytochrome-oxydase.

### *Étude du système particulaire cytoplasmique*

Le tableau 8 montre la répartition de l'acide ribonucléique entre le culot de granules et le liquide surnageant. Cette répartition est indiquée par le rapport: acide ribonucléique (granules)/acide ribonucléique (granules + surnageant). Les valeurs sont exprimées en  $\gamma$  d'acide ribonucléique par gastrula. On constate

TABLEAU 8

*Résultats des dosages d'acide ribonucléique (ARN, acide ribonucléique en  $\gamma$  par embryon)*

		Témoins		Lithinés	
		ARN	$\frac{G}{G+S}$ en %	ARN	$\frac{G}{G+S}$ en %
Exp. I	Granules (G)	5	47.6	2.5	22.7
	Surnageant (S)	5.5		8.5	
Exp. II	Granules (G)	5	43.4	2	17.3
	Surnageant (S)	6.5		9.5	

TABLEAU 9

*Mesure du rapport ARN/N total dans le culot de granules (ARN et N exprimés en  $\gamma$ )*

		ARN	N	$\frac{ARN}{N}$ en %
Exp. I	Témoins	7.36	10.83	67.9
	Lithinés	7.36	15.9	46.2
Exp. II	Témoins	14.0	17.29	80.9
	Lithinés	13.6	23.37	58

que la répartition de l'acide ribonucléique entre les particules sédimentables et le surnageant est profondément modifiée chez les embryons lithinés. Chez les embryons témoins, la teneur des granules en acide ribonucléique est de 45 pour cent, elle s'abaisse à 22 et 17 pour cent respectivement chez les embryons lithinés. Afin de contrôler ces résultats, nous avons étudié directement le rapport: acide ribonucléique/N total, sur le culot de particules sédimentables. Les valeurs obtenues sont données dans le tableau 9. On remarque également, chez les embryons lithinés, une diminution de l'acide ribonucléique dans le matériel particulaire sédimentable.

## DISCUSSION

L'ion lithium modifiant profondément le développement embryonnaire de la grenouille, en mettant en jeu les mécanismes de la détermination, quelles relations pouvons-nous établir entre les caractères morphologiques d'une part et les caractères biochimiques d'autre part, des effets de cet ion sur le développement embryonnaire?

L'action de l'ion lithium sur la détermination ressort de l'examen des embryons lithinés dont la structure subit des remaniements pouvant atteindre une ampleur considérable. Cette action se situe au niveau des tissus présomptifs, dont elle modifie le sort. Les transformations chorde présomptive en somites, somites présomptifs en pronéphros, en sont des exemples significatifs. L'axe chordomésoblastique est non seulement troublé dans son organisation, mais son pouvoir d'induction lui-même est abaissé sous l'action du lithium ainsi que l'a montré Hall (1942), dans ses expériences d'explantation. L'axe neural est également atteint, les annexes sensorielles sont réduites ou supprimées, le cerveau est atrophié. Il s'agit non seulement d'une diminution de la capacité inductrice du chordomésoblaste, mais la compétence de l'épiblaste est également diminuée (Lallier, 1952, 1953; Lombard, 1952).

Ce bref aperçu de la morphologie de l'embryon lithiné montre combien les mécanismes impliqués dans la détermination embryonnaire sont sensibles à l'action du lithium. Cette étude ayant mis en évidence certaines particularités du métabolisme glucidique, chez les embryons lithinés, il nous reste maintenant à établir les relations entre ces données biochimiques et les conséquences morphologiques du traitement au chlorure de lithium.

Chez les embryons lithinés, l'utilisation des glucides est nettement ralentie, l'inhibition portant à la fois sur la glycolyse et sur la respiration.

Bien que chez l'embryon d'amphibien, la glycolyse anaérobie s'accroisse au cours du développement (Brachet, 1934), et qu'elle soit particulièrement intense au niveau de l'organisateur (Boell, Needham, & Rogers, 1939), la signification de ce phénomène dans la morphogenèse n'apparaît pas encore clairement. Les effets de divers inhibiteurs de la glycolyse, tels la monoiodacétamide et le fluorure de sodium, sur le développement ont été décrits par Brachet (1938). Aucune de ces substances ne conduit aux remarquables effets morphologiques du lithium. Il semble ainsi peu probable que l'inhibition de la glycolyse anaérobie puisse jouer un rôle déterminant dans l'action du lithium.

Au cours du développement, la consommation d'oxygène s'accroît. Une liaison étroite existant entre la respiration et la morphogenèse, il est normal de penser qu'une inhibition de la respiration retentisse sur le développement. L'ion lithium inhibe notablement la respiration de l'embryon; cependant cette inhibition peut être provoquée par des facteurs très variés, sans entraîner l'apparition d'anomalies morphologiques, comparables à celles provoquées par le lithium.



Il n'apparaît ainsi aucune relation directe entre ces anomalies et l'inhibition de la respiration.

On se trouve placé devant une situation analogue en examinant l'activité des systèmes déshydrogénasiques. Celle-ci est fortement déprimée chez les embryons lithinés et ce phénomène peut rendre compte de l'inhibition de la respiration. L'effet, sur le développement embryonnaire de la grenouille, de certaines substances inhibitrices des déshydrogénases, étudié par Parnas & Krasinska (1921), Brachet (1934), montre qu'aucune de ces substances ne provoque d'altérations morphologiques comparables à celles observées avec le chlorure de lithium. Le mode d'action de ces inhibiteurs est d'ailleurs complexe et leur action s'étend également au cytoplasme dont ils modifient les propriétés physiques (Heilbrunn, 1920). L'iodacétamide, la chloropicrine, utilisées par Brachet (1944) et la chloracétophénone (Beatty, 1951) sont également capables d'inhiber certaines déshydrogénases par blocage de leurs groupements sulfhydriles. Cependant, ces substances ne produisent pas les hypomorphoses caractéristiques de l'action du lithium.

Le quotient respiratoire conserve la même valeur chez les embryons témoins et chez les embryons lithinés, malgré une nette inhibition de la respiration chez ces derniers. Ce fait peut indiquer que seule la quantité des substrats oxydés par l'embryon est diminuée sans que la nature de ces substrats soit modifiée. Cette interprétation ne peut toutefois être adoptée sans restriction avant l'analyse détaillée de l'utilisation des divers substrats au cours du développement. En effet, des substrats fort différents peuvent être oxydés sans entraîner de modifications appréciables du quotient respiratoire.

En contraste avec les embryons normaux, les embryons lithinés ne présentent qu'un accroissement partiel ou nul de la consommation d'oxygène en présence de divers substrats intermédiaires de la dégradation des glucides. Les embryons normaux possèdent un équilibre enzymatique leur permettant d'oxyder les substrats d'origine endogène et de répondre par un accroissement de la consommation d'oxygène à l'addition de substrats exogènes. Cette propriété est perdue ou très diminuée chez les embryons lithinés, dont la capacité normale d'utilisation des substrats endogènes est déjà fortement réduite.

Ces expériences nous indiquent que le métabolisme des glucides est fortement perturbé chez les embryons lithinés. Cependant cet effet ne semble pas suffisant à lui seul pour expliquer les caractères de l'action de l'ion lithium sur la morphogénèse. Les effets de l'ion lithium sont-ils dus à son action sur le système particulaire intracellulaire? Un certain nombre de considérations plaident en faveur de cette hypothèse.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de ces granules sédimentables intracellulaires. On sait maintenant que ceux-ci possèdent les éléments enzymatiques indispensables, assurant l'oxydation de divers métabolites glucidiques et lipidiques, et la synthèse de composés à liaisons phosphoriques riches en énergie. A leur niveau s'établissent ainsi d'importants transferts d'énergie

nécessaires aux synthèses endergoniques. Ces granules joueraient également un rôle particulièrement important dans la synthèse des protéines cellulaires. Ils sont notamment riches en acide ribonucléique et les rapports entre la synthèse des protéines et la concentration en acide ribonucléique ont été nettement mis en évidence grâce aux travaux de Brachet et de Caspersson. Au cours du développement embryonnaire chez les Amphibiens, Brachet (1940) a montré l'accumulation de ces granules ribonucléiques aux points où la morphogenèse est la plus active. Le traitement au chlorure de lithium entraînant une diminution générale de la basophilie due à ces granules ribonucléiques (Lallier, 1952), la liaison entre la diminution de la basophilie et les hypomorphoses apparaît ainsi significative. Elle traduit à l'échelle histologique ce que nous avons observé à l'échelle histochimique, c'est à dire un bouleversement de la répartition de l'acide ribonucléique fixé aux granules. Il existe donc un parallélisme frappant d'une part entre la richesse en acide ribonucléique et l'activité morphogénétique, d'autre part entre la diminution de l'acide ribonucléique fixé aux granules et la diminution de l'activité morphogénétique exprimée par les hypomorphoses.

De nombreux travaux ont montré que ces granules constituent une population très variée, formant des groupes de composition différente et assumant des fonctions diverses. Ces granules doivent évoluer à la fois qualitativement et quantitativement au cours du développement embryonnaire (Brachet & Chantrenne, 1942), et des liaisons fonctionnelles plus ou moins labiles s'établissent vraisemblablement entre ces particules. Il y a là, pour reprendre l'expression de Weiss appliquée aux molécules, toute une écologie particulière dont l'analyse est seulement commencée. Cette complexité des fonctions assumées au niveau des granules permet de rendre compte de la multiplicité des effets de l'ion lithium sur le métabolisme et sur la morphogenèse. Le lithium, en lésant les granules, atteint les mécanismes enzymatiques liés à ces granules. On conçoit ainsi que le métabolisme des glucides soit modifié, ainsi que l'élaboration des protéines spécifiques intervenant au cours de la morphogenèse. Certes une inhibition de l'utilisation des glucides doit influencer sur la synthèse des protéines; c'est en effet l'oxydation des glucides qui fournit la majeure partie de l'énergie nécessaire aux synthèses de matériel cellulaire. Mais dans l'action du lithium, les effets morphologiques ne paraissent pas directement subordonnés aux anomalies du métabolisme glucidique. Ils résultent, au contraire, d'un effet direct de l'ion lithium sur le matériel particulaire; celui-ci réagissant à la fois le métabolisme glucidique et la synthèse des protéines, on conçoit qu'il puisse exister une relation entre l'inhibition du métabolisme glucidique et les effets morphologiques du lithium, sans que celle-ci soit nécessairement une relation directe de cause à effet. L'antagonisme entre les ions lithium et potassium, déjà signalé, tant du point de vue morphologique que métabolique, est également susceptible d'être interprété selon ces considérations. En effet, la richesse des mitochondries en potassium (Pressman & Lardy, 1952), la participation de cet ion à diverses étapes du métabolisme glucidique, telle qu'elle est mise en évidence dans de nombreux travaux,

font ressortir nettement l'importance des relations entre les ions, les granules et le métabolisme des glucides. Le fait que l'ion lithium puisse interférer avec chacun de ces facteurs, précise encore l'intérêt de l'étude du matériel particulière au cours de l'action du lithium.

Ces considérations ne restent pas limitées aux Amphibiens. Chez l'Oursin, également, le lithium modifie la détermination embryonnaire, et il est intéressant de constater que sur ce matériel, Lindahl (1936) a trouvé une action de cet ion sur le métabolisme glucidique. Plus récemment Gustafson (1952), Gustafson & Lenicque (1952), étudiant l'évolution des systèmes enzymatiques chez les embryons normaux et lithinés ont émis l'hypothèse d'une action du lithium sur la genèse des mitochondries.

Malgré la diversité des organismes considérés dans ces études, l'oursin, la grenouille, il est intéressant de faire ressortir, et sans doute y a-t-il là plus qu'une coïncidence, la liaison entre l'action du lithium sur les mécanismes de la détermination embryonnaire, l'altération du métabolisme glucidique et les modifications du système particulière.

#### RÉSUMÉ

1. L'action du chlorure de lithium sur le métabolisme des glucides est étudié chez l'Amphibien *Rana temporaria*.
2. La glycolyse anaérobie est inhibée chez les embryons lithinés.
3. Le chlorure de lithium, sans action sur l'activité *in vitro* de l'hexokinase et de l'aldolase, inhibe l'activité de la triosephosphatedéshydrogénase.
4. Le chlorure de lithium inhibe l'accroissement de la consommation d'oxygène au cours du développement embryonnaire.
5. Le traitement au chlorure de lithium ne modifie pas le quotient respiratoire.
6. En présence de substrats intermédiaires de la dégradation des glucides, les gastrulas normales présentent un accroissement de la consommation d'oxygène. Cet accroissement est nul ou peu marqué chez les gastrulas lithinées.
7. L'ion potassium compense l'inhibition de la respiration chez la gastrula lithinée, et restaure la consommation d'oxygène à son niveau normal.
8. L'activité déshydrogénasique est inhibée de 25 pour cent chez les gastrulas lithinées.
9. Le chlorure de lithium ne modifie pas l'activité de la cytochrome-oxydase.
10. Le matériel particulière sédimentable intracytoplasmique, mitochondries et microsomes, subit une perte notable d'acide ribonucléique chez les gastrulas lithinées.
11. Cet effet de l'ion lithium sur le matériel particulière apparaît fondamental dans la genèse des altérations morphologiques et métaboliques observées au cours du développement embryonnaire.

#### SUMMARY

1. The action of lithium chloride on the metabolism of carbohydrates was investigated in the amphibian *Rana temporaria*.

2. Anaerobic glycolysis was inhibited in lithium-treated embryos.
3. Lithium chloride had no action on the activity *in vitro* of hexokinase and aldolase, but inhibited the activity of triosephosphate-dehydrogenase.
4. Lithium chloride inhibited the increase in oxygen consumption during embryonic development.
5. Lithium treatment did not modify the respiratory quotient.
6. Normal gastrulae, in the presence of intermediary substrates of carbohydrate breakdown, showed an increased oxygen consumption. This increase was slight or absent in lithium-treated gastrulae.
7. Potassium ions compensated for the inhibition of respiration in lithium-treated gastrulae, and restored oxygen consumption to normal.
8. Dehydrogenase activity was 25 per cent. inhibited in lithium-treated gastrulae.
9. Lithium chloride did not affect the activity of cytochrome-oxidase.
10. The intracytoplasmic sedimentable particulate material, mitochondria and microsomes, suffered a considerable loss of ribonucleic acid in lithium-treated gastrulae.
11. This effect of the lithium ion on the particulate material seems to be fundamental in the development of the morphological and metabolic alterations appearing in the course of embryonic development.

#### TRAVAUX CITÉS

- ADELMANN, H. B. (1934). A study of cyclopia in *Amblystoma punctatum*, with special reference to the mesoderm. *J. exp. Zool.* **67**, 217-68.
- BARKER, S. B., & SUMMERSON, W. H. (1941). The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. biol. Chem.* **138**, 535-54.
- BARRENSCHEEN, H. K., & PEHAM, A. (1942). The photometric estimation of nucleosides and nucleotides using the orcinol reaction. *Hoppe-Seyl. Z.* **272**, 81-86.
- BATAILLON, E. (1912). La parthénogenèse des Amphibiens et la 'Fécondation chimique' de Loeb (Étude analytique). *Ann. Sci. nat. Zool.* **16**, 249-307.
- BEATTY, R. A. (1951). Effects of chloracetophenone and di-isopropylfluorophosphate on amphibian eggs. *Proc. roy. Soc. B*, **138**, 575-99.
- BOELL, E. J., NEEDHAM, J., & ROGERS, V. (1939). Morphogenesis and metabolism studies with the cartesian diver ultramicromanometer. I. Anaerobic glycolysis of the regions of the amphibian gastrula. *Proc. roy. Soc. B*, **127**, 322-56.
- BRACHET, J. (1934). Étude du métabolisme de l'œuf de Grenouille (*Rana fusca*), au cours du développement. I. La respiration et la glycolyse de la segmentation à l'éclosion. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **45**, 611-727.
- (1938). L'action de l'acide mono-iodacétique et du fluorure sur le développement et le métabolisme des œufs d'Amphibiens. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **129**, 18-19.
- (1940). Étude histochimique des protéines au cours du développement embryonnaire des Poissons, des Amphibiens et des Oiseaux. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **51**, 167-202.
- (1944). *Embryologie chimique*, Paris: Masson.
- & CHANTRENNE, H. (1942). Nucléoprotéides libres et combinés sous forme de granules chez l'œuf d'Amphibiens. *Acta biol. belg.* **4**, 451-4.
- CORI, G. T., SLEIN, M. W., & CORI, C. F. (1948). Crystalline d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *J. biol. Chem.* **173**, 605-18.
- GUSTAFSON, T. (1952). *Nitrogen metabolism, enzymatic activity and mitochondrial distribution*



- in relation to differentiation in the sea urchin egg.* Uppsala: Almqvist & Wiksells Boktryckeri.
- & LENICQUE, P. (1952). Studies on mitochondria in the developing sea urchin egg. *Exp. Cell. Res.* **2**, 251–74.
- HALL, T. S. (1942). The mode of action of lithium salts in amphibian development. *J. exp. Zool.* **89**, 1–33.
- HEILBRUNN, L. V. (1920). Physical effects of anesthetics upon living protoplasm. *Biol. Bull. Wood's Hole*, **39**, 307–15.
- LALLIER, R. (1950). Contribution à l'étude de l'action du lithium sur les embryons d'Amphibiens. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris*, **32**, 451–7.
- (1952). Chlorure de lithium et développement embryonnaire (aspects cytochimiques et morphologiques). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **235**, 260–2.
- (1953). Recherches sur le problème de la détermination embryonnaire chez les Amphibiens et chez les Echinodermes. Thèse. Paris.
- LEHMANN, F. E. (1937). Mesodermisierung des präsumptiven Chordamaterials durch Einwirkung von Lithium chlorid auf die Gastrula von Triton alpestris. *Roux. Arch. EntwMech. Organ.* **136**, 112–46.
- LEPLAT, G. (1920). Action du milieu sur le développement des larves d'Amphibiens. Localisation et différenciation des premières ébauches oculaires chez les vertébrés. Cyclopie et anophtalmie. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **30**, 231–320.
- LINDAHL, P. E. (1936). Zur Kenntnis der physiologischen Grundlagen der Determination im Seeigelkeim. *Acta. zool., Stockh.* **17**, 179–365.
- LOMBARD, G. L. (1952). An experimental investigation on the action of lithium on amphibian development. 's Gravenhage: Excelsior foto-offset.
- MEYERHOF, O. (1927). Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskel Extrakt. III. Mitteilung: die Milchsäurebildung aus den Gärfähigen Hexosen. *Biochem. Z.* **183**, 176–215.
- PARNAS, J. K., & KRASINSKA, Z. (1921). Metabolism of amphibian larvae. *Biochem. Z.* **116**, 108–37.
- PASTEELS, J. (1945). Recherches sur l'action du LiCl sur les œufs d'Amphibiens. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **56**, 105–83.
- PRESSMAN, B. C., & LARDY, H. A. (1952). Influence of potassium and other alkali cations on respiration of mitochondria. *J. biol. Chem.* **197**, 547–56.
- QUASTEL, J. H., & WHEATLEY, A. H. M. (1938). Anaerobic oxidation of ferricyanides as a reagent for the manometric investigation of dehydrogenase systems. *Biochem. J.* **32**, 936–43.
- SPIEGEL, M. (1951). A method for the removal of the jelly and vitelline membrane of the egg of *Rana pipiens*. *Anat. Rec.* **3**, 544.
- STOTZ, E. (1939). The estimation and distribution of cytochrome oxidase and cytochrome C in rat tissues. *J. biol. Chem.* **131**, 555–65.
- TÖNDURY, G. (1937). Über experimentell erzeugte Mikrokephalie bei Urodelen. *Roux. Arch. EntwMech. Organ.* **136**, 529–62.
- WAJZER, J. (1949). Test spectrophotometrique de l'hexokinase. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **229**, 1270–2.

(Manuscript received 31:v:54)

# The Incorporation of Labelled Amino-acids into Amphibian Embryos

by C. H. WADDINGTON and J. L. SIRLIN<sup>1</sup>

*Institute of Animal Genetics, Edinburgh*

---

## INTRODUCTION

THE production of different cell types during embryonic development must depend to a major extent on the synthesis of specific substances, or mixtures of substances, characterizing the various tissues. It seems probable that such differential syntheses begin at an early stage, probably very soon after determination occurs. Up to the present rather little is known about them. The earlier biochemical work on young embryos, summarized in such works as those of Needham (1942) and Brachet (1944), dealt largely with the respiratory or glycolytic metabolism and threw only indirect light on the formation of the substances which cause developing cells to become differentiated. In the last few years a more direct attack on the problem has been made by such workers as Brachet (1952 and previously) in his studies on the appearance and distribution of nucleic acids and sulphhydryl-containing proteins, and Ebert (1952), Clayton (1953), and others who have used immunological methods to detect newly synthesized substances.

One method of investigating the processes of protein metabolism in early embryos is to study the rate of incorporation of isotope-labelled amino-acids. A considerable amount of work of this kind has been carried out on echinoderm eggs (cf. Hultin, 1953), the isotopes used being  $N^{15}$  and  $C^{14}$ , and the incorporation from inorganic compounds (acetate and ammonium salts) being studied as well as that from amino-acids. In this, and a subsequent paper by Feldman & Waddington (1955), preliminary reports are given of investigations on two types of vertebrates, namely amphibia and birds. The isotopes employed were  $C^{14}$  and  $S^{35}$ , made available as glycine-1- $C^{14}$  and glycine-2- $C^{14}$  and methionine- $S^{35}$ .

We have been particularly interested to search for evidence of differential incorporation into different tissues, since this would indicate the relevance of protein synthesis to the early phases of differentiation. This problem has been previously studied by Friedberg & Eakin (1949), Eakin, Kutsky, & Berg (1951), and Flickinger (1954). We have, in some experiments, used an autoradiographic method of assessing the concentration of radioactive amino-acid in the various

<sup>1</sup> *Authors' address:* Institute of Animal Genetics, West Mains Road, Edinburgh 9, U.K.

regions of the embryo. Some attention has also been paid to the effect, on the incorporation of these amino-acids, of certain amino-acid analogues, the two most fully studied being *p*-fluoro-phenyl-alanine (for a sample of which we are very grateful to Professor S. Spiegelman) and ethionine.

A short account of the work was given at a meeting held in London in January 1954 under the auspices of the *Journal of Embryology and Experimental Morphology* (cf. *Nature*, 1954, **173**, 517–20). At the same meeting Brachet described work on the incorporation of labelled amino-acids into amphibian embryos carried out in his laboratory by Ficq (Ficq, 1954).

#### METHODS

Axolotl and *Xenopus* embryos were placed in small capsules containing the solutions of the labelled amino-acids or other substances and allowed to develop at 18° C. The bottom of the capsule was covered with a layer of 2 per cent. agar to prevent adhesion of the embryos to the glass. The vitelline membranes were removed. Friedberg & Eakin (1949) found that the diffusion of amino-acids was impeded by the surface coat, and therefore in blastulae or gastrulae destined for autoradiography either the blastocoel or the archenteron were slit open. All later stages, and all embryos used for Geiger counter estimations, were cut in halves; this caused some morphological abnormalities in the development of embryos transected at early stages, but it is unlikely that these changes would alter the chemical processes with which the experiments were concerned.

The chemicals were dissolved in one-fifth strength Holtfreter solution. To preserve aseptis, addition was made of 0.02 per cent. sodium sulphadiazine (May & Baker), which is harmless to the embryos and further helps to keep the pH near 6.9 without the presence of buffer. All materials and solutions were sterile, and aseptic precautions were taken throughout. Only embryos of normal appearance after decapsulation were employed in the experiments.

Some preliminary autoradiographs were made with Axolotl embryos. These were fixed in 10 per cent. trichloroacetic acid, embedded in paraffin, and made into very thick sections (50 $\mu$ ). They were coated with Kodak stripping film and given an exposure of 15 days. This was found to result in a blackening of the film which was much too intense for quantitative work, although one or two useful qualitative points emerged.

In later work, with *Xenopus* embryos, the fixation was in Carnoy's fluid and sections were cut at 8 $\mu$ . After dewaxing the sections were coated with from one to three layers of gelatin by being plunged into a 0.5 per cent. solution and then allowed to dry. By weighing coverslips of known area treated in a similar way it was found that the thickness of each gelatin layer was about 0.1 $\mu$ . This is too small to impair the resolution of the autoradiograph (Doniach & Pelc, 1950), and it was thought that the treatment would make it easier to discriminate between grains in the photographic emulsion and pigment granules in the cells. All the autoradiographs used for the grain-counting mentioned in this paper

have been treated in this way. Experience has shown, however, that in autoradiographs stained through the film after development and mounted in balsam, no difficulty arises in making this distinction even without the aid of a gelatin layer, and the use of such layers has therefore been discontinued.

The number of grains appearing over various regions of the sections was counted under an oil objective, the area covered for each count being three adjacent squares of a graticule, each covering  $54\mu^2$ . Areas to be counted were chosen some distance apart, so that there was no question of mutual overlap by the spreading of the radiations; the resolution in the autoradiograph is about  $3\mu$ .

For activity measurements in the Geiger counter the embryos after removal from the glycine- $C^{14}$  were rinsed twice in saline with a similar concentration of non-labelled glycine. They were then fixed in 10 per cent. trichloroacetic acid, and a precipitate, mainly composed of protein, was obtained by the method of Friedberg & Eakin (1949). The precipitate was spread on several small aluminium planchettes, air-dried overnight under a 60-watt lamp, and the activity measured with a thin windowed Geiger counter. Counting was timed so as to ensure a standard deviation less than 5 per cent., and the rates were corrected for self-absorption of  $\beta$ -particles. Finally the weight of the precipitate was obtained.

## RESULTS

### 1. Autoradiographs

For the first set of autoradiographs, cut at  $50\mu$ , Axolotl embryos of various stages between the two-cell and mid tail-bud stages were kept for periods of from 1 to 3 days either with glycine- $C^{14}$  or with methionine- $S^{35}$ . As mentioned above, the autoradiographs were too dark for detailed quantitative examination. Visual estimation of the degree of blackening, however, gave a clear indication that, at least during stages up to the early tail-bud, there is a preferential incorporation of the amino-acids into the nuclei as contrasted with the cytoplasm. There was also probably some preferential incorporation into the cell membranes, but the evidence for this was not quite so unequivocal. Both amino-acids behaved rather similarly in these respects, although the tendency of methionine to be accumulated in the nucleus was perhaps rather less marked than that of glycine. Further experiments on the distribution of labelled amino-acids within the cell are in progress.

The incorporation into different regions of the embryo was investigated in three anterior halves of *Xenopus* embryos of rotation to gill-bud stages (Weisz's stages 14-18), which were kept for 21 hours with glycine- $C^{14}$  (activity  $16.6 \mu\text{c./c.c.}$ ). The counts in the autoradiographs are given in Table 1. It will be seen that the overall grain densities correspond with the exposure times. In any one embryo the differences of the mean counts in the various tissues are statistically significant, except for the neural tube-notochord comparison in embryo 4L and the epidermis-mesoderm in 4P. In the latter case, however, the epidermis may



be underestimated, since the grain density is near the upper limit that can be accurately assessed in this way.

TABLE 1

*Radiographs of Xenopus embryos treated with glycine-1-C<sup>14</sup>*

	Mean grain counts and standard errors for graticule square (54 $\mu^2$ )		
	4L 4 days	4V 6 days	4P 8 days
Embryo . . . . .			
Exposure . . . . .			
Epidermis . . . . .	24.17 $\pm$ 1.07	41.50 $\pm$ 1.60	75.26 $\pm$ 2.40
Somitic mesoderm . . . . .	20.46 $\pm$ 1.00	31.78 $\pm$ 1.62	72.17 $\pm$ 2.86
Neural tube . . . . .	12.91 $\pm$ 0.72	16.65 $\pm$ 0.79	47.17 $\pm$ 1.32
Notochord . . . . .	14.18 $\pm$ 0.61	14.57 $\pm$ 0.58	26.72 $\pm$ 1.71
Endoderm . . . . .	3.66 $\pm$ 0.33	6.83 $\pm$ 0.47	7.35 $\pm$ 0.48
Background . . . . .	3.50 $\pm$ 0.33	3.66 $\pm$ 0.27	2.25 $\pm$ 0.22
Squares counted per tissue . . . . .	69 <sup>1</sup>	78	68

<sup>1</sup> Background counted in 63 squares.

It will be seen that, in all embryos, the serial order of the tissues in tracer uptake is the same, except for the non-significant difference of neural tube and notochord in 4L. Epidermis always shows the greatest uptake. It cannot be excluded that this is partly due to the greater availability of the amino-acid to this tissue, but differences in diffusion path cannot be held responsible for all the variations found; it could not account, for instance, for the lower uptake in neural tube as compared with somitic mesoderm, or for the very low uptake in the endoderm.

It will be noticed that, although the order of the tissues remains the same in the three embryos, the ratios between them alter rather considerably. Further study will be necessary before the significance of this can be properly assessed, but it seems likely that it is related to differences in the age of the specimens. As judged by the development of the eye-cups in the sections, the developmental stage increased from 4L through 4V to 4P. On this basis one might advance the tentative hypothesis that the rate of incorporation in the axial mesoderm and neural tube increases in later stages in comparison with that into the epidermis, while that into the notochord remains low, perhaps as a consequence of the swelling of the cells of this organ with a relatively watery sap.

## 2. Effect of an amino-acid analogue on incorporation

Geiger counter measurements of incorporation into parts of the embryo have not been made, but the instrument has been used to investigate the incorporation into whole embryos and the effect on this of the antagonistic amino-acid analogue *p*-fluoro-phenyl-alanine (FPA). The upper part of Table 2 gives the results of two replicated experiments. In experiment P17, 20 transected late blastulae of *Xenopus* were kept at 18° C. for 18 hours in a solution of glycine-2-C<sup>14</sup> (activity 2.7  $\mu$ C./c.c.) and the same number in a similar solution with FPA added, the molecular ratio of glycine to FPA being 1:30. In experiment P18

conditions were similar, except that 30 embryos were used in each solution. At the end of the experiment the embryos appeared perfectly healthy, there being no obvious effect of the amino-acids on their morphological development. The

TABLE 2  
*Glycine-2-C<sup>14</sup> uptake by proteins of Xenopus embryos*

Experi- ment	Medium	Weight of proteins (mg.)	Specific activity (counts/min./mg.)	Mean specific activity and S.E. (counts/min./mg.)	Probability of the difference	Combined probability
P17	glycine	1.20	187.0	193.3	< 0.1	< 0.001
		1.70	219.8	±10.5		
		1.00	169.3	(= 100%)		
		0.90	197.3			
	glycine + FPA	1.00	172.7	169.5		
		0.95	176.1	±3.5		
		1.50	159.6	(= 87.6%)		
		0.85	169.7			
P18	glycine	0.92	112.9	105.9 ±2.9 (= 100%)	c. 0.001	
		1.56	102.9			
		1.22	113.5			
		1.26	100.4			
		1.64	110.0			
		0.88	96.2			
	glycine + FPA	1.10	96.2	83.0 ±4.1 (= 78%)		
		1.62	78.4			
		0.78	95.2			
		1.20	73.0			
		1.30	80.4			
		1.14	75.0			
P19	glycine + FPA + PA	1.99	57.8	57.9	< 0.001	
		0.50	55.4	±1.0		
		2.09	57.8	(= 131.5%)		
		1.51	60.7			
	glycine + FPA	1.97	40.7	44.4		
		1.10	46.6	±1.6		
		1.81	42.7	(= 100%)		
		0.88	47.8			

two experiments should not be compared with one another; but comparison of the two halves of each experiment provides definite evidence that the analogue has caused a reduction in the rate of uptake of the glycine.

In another experiment, No. P19, the specificity of the inhibition by FPA was tested by seeing whether it could be alleviated by L-phenyl alanine (PA), which is the structurally related normal amino-acid. In this experiment 20 transected late blastulae of *Xenopus* were allowed to develop for 24 hours at 18° C. in a solution containing glycine-2-C<sup>14</sup> and FPA in the molecular ratio 1:73, the activity of the solution being 1.16 $\mu$ c./c.c.; and another 20 embryos were kept in a similar solution with added PA, the ratio of PA to FPA being 1:2. The activity of the proteins is given in the lower part of Table 2. It will be seen that

the uptake in the solution with added PA is considerably higher (113.5 per cent.) than that with FPA alone.

No effects of the FPA on morphogenesis were noted, nor did it cause any obvious slowing-down of development, but no exact studies on development rate have yet been made.

#### DISCUSSION

The results reported in this paper are of a preliminary nature and do more to reveal the magnitude of the field of investigation opened up by these methods than to provide secure material for an extended discussion.

It is to be expected that glycine will be incorporated into the nucleic acids of the embryo as well as the proteins. Its partition between these two groups of substances is at present under investigation. The results reported in this paper do not make possible any discrimination between them, since the histological procedures used in preparing the autoradiographs would have removed the fats and free non-protein substances, but would leave the greater part of both proteins and nucleic acids.

There are, however, some points which emerge clearly even at this early stage. One of these is the preferential incorporation of glycine and methionine into the nuclei in early stages of development. The same effect has been noticed by Ficq (1954) using a different technique of autoradiography. Ficq showed that there is a considerable decrease in activity after digestion with ribonuclease or after hydrolysis with HCl, so that presumably much, though by no means all, of the glycine in the nuclei is incorporated into nucleic acid. Even so, the high activity of the nuclei is somewhat surprising, since it is usually considered that protein synthesis occurs mainly in the cytoplasm rather than the nuclei.

It is, of course, not obvious at first sight that the incorporation of labelled amino-acids into the material precipitable with trichloroacetic acid is a direct indication of the synthesis of proteins; it might merely be a consequence of exchanges between the free amino-acids and those present in already formed protein. The latter possibility is, however, rendered less likely by the observation that the rate of incorporation of glycine is reduced in the presence of a structural analogue of an unrelated amino-acid, namely FPA. The simplest explanation of this is the hypothesis that proteins are synthesized in the embryo from a pool of free amino-acids, and that an abnormal analogue inhibits the whole process of protein formation, and thus lowers the rate of incorporation even of structurally unrelated amino-acids. It is more difficult to see how the exchange-rates of unrelated amino-acids could be affected.

In considering the effects of added FPA and PA it is important to remember that considerable quantities of the normal amino-acids are likely to be made available to the embryo by the breakdown of the yolk granules which are already inside the cells. This process is already becoming visible in microscopical preparations by the gastrulation stage. The presence of free phenyl alanine

in the amphibian egg has been made probable by Holtfreter, Koszalka, & Miller (1950), who, however, were unable, with their technique, to distinguish it from leucine; and it was confirmed by Eakin, Berg, & Kutsky (1950), whose methods made this distinction possible. Kutsky, Eakin, Berg, & Kavanau (1953) have produced evidence of the existence of glycine, probably largely in the form of peptide, in amphibian embryos.

The results of the autoradiographs make it clear that, whether or not the incorporation of glycine is an indication of protein synthesis, the rate at which it occurs certainly differs considerably from tissue to tissue. Friedberg & Eakin (1949) and Eakin, Kutsky, & Berg (1951) had already found that the incorporation of labelled glycine proceeds more rapidly in the dorsal than in the ventral halves of frog gastrulae, but their method did not allow the discrimination of individual tissues. Our results show that the greater part of this difference should be attributed to the high uptake of the somite mesoderm and, to a lesser extent, to that of the neural tube. Flickinger (1954) tested the incorporation of  $C^{14}O_2$  into a number of different parts of the gastrula, and into the axial system (neural plate, notochord, and somitic mesoderm) as compared with the remainder of the neurula (epidermis and endoderm). The latest stages he studied were at a considerably younger developmental age than the embryos which we have so far investigated by autoradiographs. Our results agree with his, however, in showing that there are marked differences between different regions.

These differences are not always of the kind which previous results would lead one to expect. The low activity of the notochord is perhaps explained by the fact that, shortly after the stages investigated, it becomes distended with a fluid cell sap. But the high activity of the epidermis and low activity of the neural tube are rather unexpected. There are indications, however, that the rates of activity are changing with developmental age even within the narrow range of the specimens described here, and it may be that considerable differences in tissue activity will be found at other stages. The autoradiographic technique has the advantage that it facilitates the assessment of the activity of rather precisely defined parts of the embryo without calling for the very laborious process of dissecting sufficient material to obtain a reading on a Geiger counter. It must, however, be admitted that the counting of grains on autoradiographs is itself a rather tiring and time-consuming occupation. On the other hand, one is limited to some extent in the fractionation procedures which can be employed, although much more might be done in this way than we have yet attempted. Further, the autoradiographs only enable one to assess activity per unit volume of tissue. It is notoriously difficult in the biochemistry of amphibian embryos to know what is the best measure of the metabolizing system, and how to allow for the presence of variable quantities of inactive yolk (cf. Needham, 1942; Boell, 1948). It may be one of the defects of the autoradiographic technique that it is rather inflexible in this respect.



## SUMMARY

1. The rate of incorporation of glycine-1-C<sup>14</sup> into the tissues of *Xenopus* tail-bud embryos was estimated by counting grains in autoradiographs. The tissues differed significantly, the order of activity being epidermis > somitic mesoderm > neural tube > notochord > endoderm.

2. Less precise data indicated that the incorporation both of glycine-1-C<sup>14</sup> and methionine-S<sup>35</sup> is more rapid into the nuclei than the cytoplasm, and that there may be some differential accumulation also in the cell membranes.

3. The rate of accumulation of glycine-2-C<sup>14</sup> in acid- and acetone-insoluble material, estimated by the Geiger counter, is reduced in the presence of the amino-acid analogue *p*-fluoro-phenyl-alanine. This effect is counteracted by L-phenyl-alanine.

## ACKNOWLEDGEMENTS

While carrying out this work the junior author held a scholarship from the British Council, which he acknowledges with gratitude. The work received financial support from the Agricultural Research Council. We should also like to express our gratitude to Dr. B. Woolf for statistical assistance.

## REFERENCES

- BOELL, E. J. (1948). Biochemical differentiation during amphibian development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **49**, 773-800.
- BRACHET, J. (1944). *Embryologie chimique*. Paris: Masson.
- (1952). *Le Rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon*. Paris: Masson.
- CLAYTON, R. M. (1953). Distribution of antigens in the developing newt embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 25-42.
- DONIACH, I., & PELC, S. R. (1950). Autoradiograph technique. *Brit. J. Radiol.* **23**, 184-92.
- EAKIN, R. M., BERG, W. E., & KUTSKY, P. B. (1950). Studies in protein metabolism of the amphibian embryo. II. Free amino acids. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **75**, 32-34.
- KUTSKY, P. B., & BERG, W. E. (1951). Protein metabolism of amphibian embryo. III. Incorporation of methionine into protein of gastrulae. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **78**, 502-4.
- EBERT, J. D. (1952). Appearance of tissue-specific proteins during development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **55**, 67-84.
- FELDMAN, M., & WADDINGTON, C. H. (1955). The uptake of methionine-S<sup>35</sup> by the chick embryo and its inhibition by ethionine. *J. Embryol. exp. Morph.* (in the press).
- FICQ, A. (1954). Analyse de l'induction neurale par autoradiographie. *Experientia*, **10**, 20-21.
- FLICKINGER, R. A. (1954). Utilization of C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> by developing amphibian embryos, with special reference to regional incorporation into individual embryos. *Exp. Cell Res.* **6**, 172-80.
- FRIEDBERG, F., & EAKIN, R. M. (1949). Studies in protein metabolism of the amphibian embryo. I. Uptake of radioactive glycine. *J. exp. Zool.* **110**, 33-46.
- HOLTFRETER, J., KOSZALKA, T. R., & MILLER, L. L. (1950). Chromatographic studies of amino acids in the eggs and embryos of various species. *Exp. Cell Res.* **1**, 453-9.
- HULTIN, T. (1953). *Studies on the Structural and Metabolic Background of Fertilization and Development*. Stockholm: Kihlström.
- KUTSKY, P. B., EAKIN, R. M., BERG, W. E., & KAVANAU, J. L. (1953). Protein metabolism of amphibian embryo. IV. Quantitative changes in free and non-protein amino acids. *J. exp. Zool.* **124**, 263-78.
- NEEDHAM, J. (1942). *Biochemistry and Morphogenesis*. Cambridge: University Press.

(Manuscript received 19:vi:54)

# The Effect of Environmental Factors on the Differentiation of the Allantoic Endoderm in Organ Culture

by HONOR B. FELL, F.R.S.<sup>1</sup>

Foulerton Research Fellow, Royal Society

*From the Strangeways Research Laboratory, Cambridge*

WITH ONE PLATE

---

## INTRODUCTION

THE allantois of the chick appears at about the 3rd day of incubation as an evagination from the hind gut; it soon becomes distended with fluid, enlarges rapidly, and fuses with the chorion to form the chorio-allantoic membrane. Out of curiosity, the allantoic sac of a 4-day chick embryo was explanted in a watch-glass culture to see how it would behave *in vitro*. Under these conditions the allantoic endoderm did not develop into a flattened, granular layer as in normal embryonic life, but instead differentiated into a tall, columnar epithelium with many actively secreting goblet cells, which closely resembled that of the large intestine. This casual observation was investigated further and the results of the study are described below.

## MATERIAL AND METHODS

The allantoic sac was removed from 3½–4½-day embryos, before fusion with the chorion had taken place; the neck of the allantois, uniting the latter with the gut, was excluded from the explants. Usually the sacs were explanted whole, but the larger ones were cut in half; some were everted so that the epithelium was external.

Twenty explants were grown by the watch-glass method (Fell & Robison, 1929; Fell & Mellanby, 1952). The medium usually consisted of a mixture of 3 parts of fowl plasma and 1 part of embryo extract made from 12–13-day embryos, but in the last experiment equal parts of plasma and embryo extract were used which gave slightly better results. Six explants were grown in large hanging-drop cultures; they developed in the same way as those cultivated in

<sup>1</sup> Author's address: Strangeways Research Laboratory, Wort's Causeway, Cambridge, U.K.

[J. Embryol. exp. Morph. Vol. 2, Part 4, pp. 348–352, December 1954]

watch-glasses but were less healthy. In both types of culture the tissue was transplanted to fresh medium every 2 days and was usually maintained for 6–9 days before being fixed and sectioned. A few cultures were grown for longer periods, but the epithelium was largely degenerate; this was probably due to the dense fibrous capsule which formed round the endoderm and which would have obstructed its nutrition and respiration.

The allantoic explants were fixed for 30 minutes in 3 per cent. acetic Zenker's solution, and the slides were stained with azan or by the Periodic-acid-Schiff method (P.A.S.) usually after digestion with saliva to remove glycogen, followed by Mayer's acid haemalum. The normal allantois from a 4-day embryo and the chorio-allantoic membranes from 7-, 13-, and 16-day embryos were fixed and sectioned for comparison with the cultures.

### RESULTS

In the normal 4-day embryo the allantoic endoderm (Plate, fig. A) consists of a single layer of very flat cells covered by a loose coat of highly vascular mesoderm; at this stage the epithelium stains very slightly with the P.A.S. method, after digestion with saliva. As development proceeds the endoderm, though remaining flattened, becomes slightly thicker and acquires a two-layered structure; the cells of the inner layer are packed with granules which resist digestion with saliva and stain bright red with P.A.S. and blue with azan, while the basal cells are non-granular. The epithelium maintains this appearance until the 16th day (Plate, fig. B), the oldest stage examined.

When the 4-day allantois was cultivated in a watch-glass, during the first 2 days *in vitro* the epithelium usually contracted into an apparently solid, irregular mass surrounded by a broad, dense halo of outwandering fibroblasts. The endoderm continued to grow at the periphery, forming finger-like protrusions into the surrounding connective tissue, but the interior became opaque and necrotic. At first the outer proliferating and inner necrotic regions were continuous, but a sharp division soon appeared between them; a cyst developed lined by thick, translucent epithelium and covered externally by a layer of organized connective tissue. In a few cultures a cyst appeared at an early stage, without being preceded by internal necrosis. Fibroblasts continued to grow profusely from the margin of the explant and showed a remarkable capacity for penetrating deeply into the clot, so that it was often very difficult to detach the rudiment without injuring the epithelium. If the surface of the endoderm was anywhere exposed, it formed a sheet spreading over the emigrating fibroblasts and the surrounding clot.

The hanging-drop cultures behaved in a similar way, but the allantoic epithelium did not form a cyst and remained as an irregular flattened islet. After about 2 days, yellowish secretory material appeared in the narrow lumen of the islet and increased in amount during subsequent cultivation.

When the explants were fixed and sectioned after 6–8 days' growth (Plate, figs. C, G, H) the histology of the endoderm bore little resemblance to that of the normal allantois of equivalent age, i.e. after 13 days' incubation. In the cultures the epithelium lining the cysts was columnar or, in some areas, cubical; the cells had a brush border, and among them were scattered a variable number of typical mucus-secreting goblet cells (Plate, figs. C, G, H) which stained blue with azan and crimson with P.A.S. after digestion with saliva. In the hanging-drop preparations the goblet cells were mainly concentrated at the periphery of the epithelial islet in gland-like pockets and the central part of the islet was often rather degenerate probably owing to poor nutrition; the secretory material became extremely hard after fixation and stained intensely red with P.A.S. The epithelium in both the watch-glass and hanging-drop cultures was enclosed by a capsule of connective tissue with dense, apparently amorphous ground substance which probably interfered with the nutrition of the epithelium and accounted for the degenerative changes which appeared after 8 days.

The endoderm of the everted allantoic sacs behaved rather differently *in vitro* from that lining the explants described above. In the firm medium (3 parts plasma : 1 part embryo extract) the everted sac became attached to the clot by its cut edges from which fibroblasts emigrated and proliferated, while sheets of epithelium usually spread over the surface of the medium. The main part of the explant projected like a mushroom from the centre of this diffuse outgrowth and sections showed that it was covered by cubical, columnar, and sometimes (Plate, fig. D) by very tall cylindrical epithelium in which goblet cells were usually rare. Where the epithelium spread over the clot, however, a large proportion of the cells were secreting actively; this was also true of epithelial invaginations into the connective tissue, which behaved like simple, tubular glands, and the abrupt transition between the superficial and tubular epithelium was striking.

When grown in a softer clot (equal parts of plasma and embryo extract) the everted sacs became almost completely epithelialized, sometimes remaining attached to the medium by a short, thin stalk. Fluid accumulated in the explants which formed greatly distended, multilocular cysts. In section the walls of the cysts were seen to consist of connective tissue covered by extremely attenuated epithelium (Plate, fig. E). Small epithelial islets were often present in the connective tissue; they were composed of cubical or columnar cells with scattered, mucus-secreting elements and their lumina contained P.A.S.-positive secretion.

In many of the everted allantois grown on both types of medium there were areas of multi-layered epithelium which had frequently proliferated to form branching, papillomatous structures (Plate, fig. F); during the early stages in the formation of these outgrowths mitosis was active. The cells were often interconnected by protoplasmic bridges like those of the epidermis, and though not of the goblet type, they were secreting mucoïd material.



## DISCUSSION

The observations described above showed that in organ cultures the allantoic endoderm could display a wide range of histological variations in response to different environmental conditions. Thus it sometimes formed columnar epithelium with typical mucus-secreting goblet cells, which closely resembled that lining the large intestine and was quite unlike the flat, granular endoderm of the normal chorio-allantoic membrane; it is curious that, after only 7 days in culture, 4-day allantoic sacs were actively secreting mucus, whereas in the normal embryo, even after 16 days' incubation, there are no functional goblet cells in the gut. When the sacs were everted and grown on a firm clot the endoderm developed into high columnar or cylindrical epithelium which usually was almost or completely devoid of goblet cells, although these were present wherever the epithelium had invaginated into the underlying connective tissue. Sometimes small, papillomatous growths appeared on the everted explants, and only when the latter were grown in a soft clot and became cystic did the epithelium assume the thin, flattened structure seen in the normal allantoic endoderm.

Precisely what environmental factors were responsible for the histological changes described remains obscure. Mechanical forces must have played a part; Boyden (1924) has shown that in the embryo the normal development of the allantois depends on distension by the fluid content of the sac, and except in the dilute medium the explanted sacs were released from their normal tension. This might explain the absence of flattening, but it would not account for the differentiation of typical goblet cells which are not present in the normal allantois; nor would it explain why, in the everted sacs on the firm clot, the superficial columnar or cylindrical epithelium was usually almost or completely devoid of goblet cells whereas in the same explants these cells were always present in pockets of epithelium surrounded by connective tissue.

It is probable that the histological variations of the allantoic endoderm *in vitro* should be regarded as 'modulations' in the sense that Weiss (1949) uses the term, i.e. as reversible changes in response to environmental factors, and not as a true metaplasia or irreversible transformation.

## SUMMARY

1. When the allantoic sac of the 4-day embryonic chick was grown as an organ culture *in vitro*, the endoderm showed great variation in its histological structure.

2. The intact sac formed a closed vesicle lined by columnar epithelium containing many mucus-secreting goblet cells.

3. When everted and grown in a stiff clot, the endoderm formed a tall columnar epithelium with few or no goblet cells.

4. In a soft clot the everted sac became cystic and distended; the endoderm then resembled that of the normal chorio-allantoic membrane.

5. In places the everted endoderm formed papillomatous, secreting out-growths in both stiff and soft medium.

6. It is suggested that these histological variations represent 'modulations' of the endoderm (Weiss).

#### REFERENCES

- BOYDEN, E. A. (1924). An experimental study of the development of the avian cloaca, with special reference to a mechanical factor in the growth of the allantois. *J. exp. Zool.* **40**, 437-71.
- FELL, H. B., & ROBISON, R. (1929). The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated *in vitro*. *Biochem. J.* **23**, 767-84.
- & MELLANBY, E. (1952). The effect of hypervitaminosis A on embryonic limb-bones cultivated *in vitro*. *J. Physiol.* **116**, 320-49.
- WEISS, P. (1949). Nature of vertebrate individuality. *Proc. First National Cancer Conference*, p. 50.

#### EXPLANATION OF PLATE

Photomicrographs by Mr. V. C. Norfield, Strangeways Research Laboratory.

*e*, allantoic endoderm;

*g*, secretory granules;

*s*, secretion.

FIG. A. Allantois of a normal 4-day embryo, showing the greatly flattened endoderm. (P.A.S., Mayer's acid haemalum.  $\times 770$ .)

FIG. B. Allantoic endoderm of a normal 16-day embryo; the epithelium consists of two layers; note the secretory granules in the cells of the inner layer. (P.A.S., Mayer's acid haemalum.  $\times 770$ .)

FIG. C. Allantois from a 4-day embryo grown *in vitro* for 8 days; the endoderm has formed a columnar epithelium with many goblet cells; the marked area is shown under a higher magnification in Fig. H. (P.A.S., Mayer's acid haemalum.  $\times 13$ .)

FIG. D. Allantois from a 4-day embryo, everted and grown *in vitro* on a firm clot for 8 days. The endoderm has differentiated into a very tall, cylindrical epithelium nearly devoid of goblet cells. (Azan.  $\times 770$ .)

FIG. E. Allantois from a 4-day embryo, everted and grown on a soft clot for 8 days. The explant became cystic and dilated; the endoderm somewhat resembles that of the normal allantoic endoderm shown in Fig. B. (P.A.S., Mayer's acid haemalum.  $\times 770$ .)

FIG. F. Another region of the same explant as that shown in Fig. E; note the papilloma-like outgrowth and the P.A.S.-positive secretion. (P.A.S., Mayer's acid haemalum.  $\times 30$ .)

FIG. G. Similar culture to that shown in Fig. C; note the mucus-secreting goblet cells. (P.A.S., Mayer's acid haemalum.  $\times 770$ .)

FIG. H. Part of the same section as that shown in Fig. C; note the mucus-secreting goblet cells in the columnar epithelium. ( $\times 770$ .)

(Manuscript received 6: viii: 54)











## Part 3, September 1954

NIEUWKOOP, P. D., and NIGTEVECHT, G. V. Neural Activation and Transformation in Explants of Competent Ectoderm under the Influence of Fragments of Anterior Notochord in Urodeles	175
FICQ, A. Analyse de l'induction neurale chez les Amphibiens au moyen d'organismes marqués	194
FICQ, A. Localisation et dosage du lithium dans les embryons d'Amphibiens	204
HÖRSTADIUS, S., and GUSTAFSON, T. The Effect of Three Antimetabolites on Sea-Urchin Development	216
FAURÉ-FREMIET, E. Morphogénèse de bipartition chez <i>Urocentrum turbo</i> (Cilié holotriche)	227
TOIVONEN, S. The Inducing Action of the Bone-marrow of the Guinea-pig after Alcohol and Heat Treatment in Implantation and Explantation Experiments with Embryos of <i>Triturus</i>	239
BOUNOURE, L., AUBRY, R., et HUCK, M.-L. Nouvelles recherches expérimentales sur les origines de la lignée reproductrice chez la Grenouille rousse	245
ABERCROMBIE, M., FLINT, M. H., and JAMES, D. W. Collagen Formation and Wound Contraction during Repair of Small Excised Wounds in the Skin of Rats	264

## Part 4, December 1954

VANNINI, ENRICO, and SABBADIN, ARMANDO. The Relation of the Interrenal Blastema to the Origin of the Somatic Tissues of the Gonad in Frog Tadpoles	275
ANÉEL, P., et HOUGET, J. Présentation d'un appareil destiné à faire à de jeunes embryons d'oiseaux de petites injections localisées de substances chimiques	290
ANCEL, P. Les injections localisées en chimiotérogénèse	293
PERRY, J. S. Fecundity and Embryonic Mortality in Pigs	308
LALLIER, R. Chlorure de lithium et biochimie du développement de l'œuf d'Amphibien	323
WADDINGTON, C. H., and SIRLIN, J. L. The Incorporation of Labelled Amino-acids into Amphibian Embryos	340
FELL, HONOR B. The Effect of Environmental Factors on the Differentiation of the Allantoic Endoderm in Organ Culture	348

# Index of Authors

ABERCROMBIE, M., and BELLAIRS, R. The Effects in Chick Blastoderms of replacing the Primitive Node by a Graft of Posterior Primitive Streak	55
ABERCROMBIE, M., FLINT, M. H., and JAMES, D. W. Collagen Formation and Wound Contraction during Repair of Small Excised Wounds in the Skin of Rats	264
ANCEL, P. Les injections localisées en chimiotérotogénèse	293
ANCEL, P., et HOUGET, J. Présentation d'un appareil destiné à faire à de jeunes embryons d'oiseaux de petites injections localisées de substances chimiques	290
AUBRY, R. See BOUNOURE, L.	
BACSICH, P., and HAMILTON, W. J. Some Observations on Vitrally Stained Rabbit Ova with Special Reference to their Albuminous Coat	81
BAUD, C. A. See GALLERA, J.	
BELLAIRS, R., See ABERCROMBIE, M.	
BOUNOURE, L., AUBRY, R., et HUCK, M.-L. Nouvelles recherches expérimentales sur les origines de la lignée reproductrice chez la Grenouille rousse	245
BRØNDSTED, A. and H. V. Size of Fragment and Rate of Regeneration in Planarians	49
BRØNDSTED, H. V. See BRØNDSTED, A.	
BRIGGS, R. See KING, T. J.	
FAURÉ-FREMIET, E. Morphogénèse de bipartition chez <i>Urocentrum turbo</i> (Cilié holotriche)	227
FELL, H. B. The Effect of Environmental Factors on the Differentiation of the Allantoic Endoderm in Organ Culture	348
FICQ, A. Localisation et dosage du lithium dans les embryons d'Amphibiens	204
FICQ, A. Analyse de l'induction neurale chez les Amphibiens au moyen d'organismes marqués	194
FLINT, M. H. See ABERCROMBIE, M.	
GALLERA, J., et BAUD, C. A. Étude ultrastructurale de l'ectoblaste chez l'embryon d'Urodèle normal ou traité par l'urée	106
GUSTAFSON, T. See HÖRSTADIUS, S.	
HAMILTON, W. J. See BACSICH, P.	
HÖRSTADIUS, S., and GUSTAFSON, T. The Effect of Three Antimetabolites on Sea-Urchin Development	216



## Index of Authors

HOUGET, J. See ANCEL, P.	
HUCK, M.-L. See BOUNOURE, L.	
JAMES, D. W. See ABERCROMBIE, M.	
KÄLLÉN, B. The Embryology of the Telencephalic Fibre Systems in the Mouse	87
KING, T. J., and BRIGGS, R. Transplantation of Living Nuclei of Late Gastrulae into Enucleated Eggs of <i>Rana pipiens</i>	73
LALLIER, R. Chlorure de lithium et biochimie du développement de l'œuf d'Amphibien	323
LUTWAK-MANN, C. Some Properties of the Rabbit Blastocyst	1
MARTIN, A. V. W. An Electron Microscope Study of the Cartilaginous Matrix in the Developing Tibia of the Fowl	38
MARTINOVITCH, P. N. The Cultivation of the Pituitary of Infantile Rats by the Glass-Rod Technique and the Influence of Grafted Explants on the Growth of Hypophysectomized Hosts	14
MCLAREN, A., and MICHIE, D. Factors affecting Vertebral Variation in Mice I. Variation within an Inbred Strain	149
MEDAWAR, P. B. The Significance of Inductive Relationships in the Development of Vertebrates	172
MICHIE, D. See MCLAREN, A.	
NEWTH, D. R. Determination in the Cranial Neural Crest of the Axolotl	101
NIGTEVECHT, G. V. See NIEUWKOOP, P. D.	
NIEUWKOOP, P. D., and NIGTEVECHT, G. V. Neural Activation and Transformation in Explants of Competent Ectoderm under the Influence of Fragments of Anterior Notochord in Urodeles	175
O'CONNOR, R. J. Observations on the Nature of the Relationship between Cell Division and Carbohydrate Metabolism	26
PASTEELS, J. Les effets de la centrifugation sur la blastula et la jeune gastrula des Amphibiens. III. Interactions entre ébauches primaires et secondaires. IV. Discussion générale et conclusions	122
PERRY, J. S. Fecundity and Embryonic Mortality in Pigs	308
SABBADIN, A. See VANNINI, E.	
SIRLIN, J. L. See WADDINGTON, C. H.	

## Index of Authors

THOMAS, G. A. The Effect of Cortisone on Cell Proliferation and Migration in Peripheral Nerves undergoing Wallerian degeneration	114
TOIVONEN, S. The Inducing Action of the Bone-marrow of the Guinea-pig after Alcohol and Heat Treatment in Implantation and Explantation Experiments with Embryos of <i>Triturus</i>	239
VANNINI, E., and SABBADIN, A. The Relation of the Interrenal Blastema to the Origin of the Somatic Tissues of the Gonad in Frog Tadpoles	275
WADDINGTON, C. H., and SIRLIN, J. L. The Incorporation of Labelled Amino-acids into Amphibian Embryos	340
WENIGER, J.-P. See WOLFF, ÉT.	
WOLFF, ÉT., et WENIGER, J.-P. Recherches préliminaires sur les chimères d'organes embryonnaires d'oiseaux et de mammifères en culture <i>in vitro</i>	161







## INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

Contributions and correspondence about them should be sent to Mr. M. Abercrombie, Department of Anatomy and Embryology, University College, Gower Street, London, W.C.1, England.

Contributions should be as concise as possible. They should be typewritten, double-spaced, on one side of the paper, the pages numbered. They should be fully ready for press, since revision in proof will not be possible. Footnotes should be avoided. The author is advised to keep a copy of the typescript.

Tables should be on separate sheets, and numbered. Authors should indicate the places for their insertion in the margin of the typescript.

The Summary should be in numbered paragraphs, and will be put at the end of the text. It should not exceed 500 words.

Acknowledgements should be placed immediately before the list of references.

References should be listed alphabetically. In the text they should be referred to by the author's name and the year of publication. If more than one reference to the same author and year is quoted, use suffixes *a*, *b*, &c. (e.g. 1951*a*) in text and reference list. Papers should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title of paper; name of journal (World List of Scientific Periodicals abbreviation), underlined; volume number; first and last page: e.g. Spemann, H., & Mangold, H. (1924). *Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren*. Arch. mikr. Anat. 100, 599-683. Books should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title underlined; place of publication; publisher: e.g. Dalcq, A. (1941). *L'Œuf et son dynamisme organisateur*. Paris: Albin Michel.

*Illustrations.* Line drawings should be used wherever possible, in preference to illustrations requiring half-tone reproduction. In general, their size should be such that they are reduced for publication to approximately two-thirds linearly. When reduced, no illustration together with its lettering should exceed five inches in width, and, if it is to occupy a whole page, seven and a half inches in length. Name of author and figure number should be written on

the back, together with the proposed reduction in size. Magnification should be indicated by a scale-line drawn in Indian ink on or beside all drawings and photographs.

*Black and white line or line and dot drawings* should have all lettering or numerals put in lightly in block capitals with a soft pencil. Charts and graphs may be drawn in Indian ink on graph paper ruled in pale blue. Where several drawings are grouped as one figure, distinguish them by capital letters (in pencil). Legends for all line drawings should be typed together on a separate sheet. The places for insertion in the text should be indicated in the margin of the typescript. The drawings should be referred to in the text as 'Text-fig. 1', &c.

*Half-tone illustrations* (photographs or drawings other than black and white) will be limited in number; authors may be asked to provide a grant for an excessive number. If fine detail is not required they can be reproduced amongst the text (please indicate position), in which case they should be numbered in series with the line drawings, if any. If fine detail is required, they will be on a separate plate. The legends should then be typed on a separate sheet, headed 'Explanation of Plate(s)', and the illustrations should be referred to in the text as 'Plate 1, fig. A', &c. Leader lines should be drawn in Indian ink. All letters or numerals which are to go on the illustration, should be in pencil (block capitals) on a covering sheet of transparent paper. Lettering or numerals to go at the side should be written there in pencil (block capitals); photographs, for this purpose, should be mounted on card. If the author wishes the block-maker to pay special attention to reproducing any part of an illustration, he should indicate this on the transparent paper. Photographs should be glossy bromide prints.

*Proofs.* Authors will receive one set of proofs for correction and return to the Editor. Authors may be required to pay for an excessive number of alterations in proof, apart from printer's errors.

*Reprints.* Authors will receive fifty free reprints. Additional copies may be ordered for purchase when proofs are returned to the Editor.

# Journal of Embryology and Experimental Morphology

[J. Embryol. exp. Morph.]

---

VOLUME 2

December 1954

PART 4

---

## Contents

VANNINI, ENRICO, *and* SABBADIN, ARMANDO

The Relation of the Interrenal Blastema to the Origin of  
the Somatic Tissues of the Gonad in Frog Tadpoles 275

*With 3 plates*

ANCEL, P., *et* HOUGET, J.

Présentation d'un appareil destiné à faire à de jeunes  
embryons d'oiseaux de petites injections localisées de  
substances chimiques 290

ANCEL, P.

Les injections localisées en chimiotératogénèse 293

*Avec 2 planches*

PERRY, J. S.

Fecundity and Embryonic Mortality in Pigs 308

LALLIER, R.

Chlorure de lithium et biochimie du développement de  
l'œuf d'Amphibien 323

WADDINGTON, C. H., *and* SIRLIN, J. L.

The Incorporation of Labelled Amino-acids into Am-  
phibian Embryos 340

FELL, HONOR B.

The Effect of Environmental Factors on the Differentiation  
of the Allantoic Endoderm in Organ Culture 348

*With 1 plate*



